Dreidimensionale Rekonstruktionen frühembryonaler Nervenfasern in der Wachtel-Retina: eine TEM-Untersuchung nach Optimierung der Gewebestrukturerhaltung mit Gefrierfixierungs- und Gefriersubstitutionsmethoden.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Dieter Meißner

aus Stuttgart

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0080

Dreidimensionale Rekonstruktionen frühembryonaler Nervenfasern in der Wachtel-Retina: eine TEM-Untersuchung nach Optimierung der Gewebestrukturerhaltung mit Gefrierfixierungs- und Gefriersubstitutionsmethoden.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Dieter Meißner

aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	19. Dezember 1986
Dekan:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Schwarz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	V
I. EINLEITUNG.	1
II. MATERIALIEN UND METHODEN.	9
1. Chemikalien und Lösungen.	9
1.1. Chemikalien.	9
1.2. Lösungen.	10
2. Inkubation, Präparation und Vorfixierung der Embryonen.	11
3. Gefrierfixierung und Gefriersubstitution.	12
3.1. Test verschiedener Gefrierschutzmittel.	12
3.2. Test verschiedener Bedingungen für Vorfixierung und Inkubation in Gefrierschutzmittel.	14
4. Präparation von Retinae für Schnittserien.	17
5. Trimmen und Schneiden.	18
5.1. Einzelschnitte.	18
5.2. Serienschnitt-Technik.	18
5.2.1. Trimmen.	18
5.2.2. Schneiden und Übertragen.	19
5.2.3. Berechnung der durchschnittlichen Schnittdicke.	24
6. Befilmen von Grids.	25
7. Schnittkontrastierung.	27
8. Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop.	28
9. Dreidimensionale Rekonstruktionen.	29
9.1. Ausrichten der EM-Aufnahmen (Alignment).	30
9.2. Computer-gestützte 3D-Grafik.	31

Seite

III. ERGEBNISSE 38

1. Gefrierfixierung und Gefriersubstitution. 38
1.1. Test verschiedener Gefrierschutzmittel.
1.2. Test verschiedener Bedingungen für Vorfixierung und Inkubation in Gefrierschutzmittel.

2. Dreidimensionale Rekonstruktionen. 52
2.1. Rekonstruktionen an 60 Stunden alten Embryonen.
2.2. Rekonstruktionen an 68 Stunden alten Embryonen.
2.3. Einzelaufnahmen von Retinae 77-78 Stunden alter Embryonen.

IV. DISKUSSION 82

V. ZUSAMMENFASSUNG 93

VI. LITERATURVERZEICHNIS 95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Präparationsschema für Gefriersubstitution und konventionelle Einbettung bei Raumtemperatur.

Abb. 2: Serienschnitt-Technik.

Abb. 3: Übertragungsvorgang bei der Serienschnitt-Technik.

Abb. 4: Schematische Darstellung der Serienschnitt-Methode.

Abb. 5: Befilmen von Grids.

Abb. 6: Eintragen von Koordinatenpunkten auf Tuschezeichnungen.

Abb. 7: Digitalisieren der Aufnahmenbänder und Zeichnungen.

Abb. 8: Vom EM-Negativ zur 3D-Computergrafik.

Abb. 9: Gefrierfixierung ohne Gefrierschutz.

Abb. 10: Bestimmung der optimalen Gefrierschutzmittelkonzentration.

Abb. 11: Glycerin als Gefrierschutzmittel.

Abb. 12: DMSO und DMF als Gefrierschutzmittel.

Abb. 13: Inkubation in DMSO nach und während der Perfusionsfixierung.

Abb. 14: Inkubation in DMF nach und während der Perfusionsfixierung mit GA.

Abb. 15: Inkubation in DMF nach und während der Perfusionsfixierung mit FA/GA.

Abb. 16: Orientierungszeichnung der Rekonstruktion SER1.

Abb. 17: 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER1: Neurone und Vitrea.

Abb. 18: 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER1: extrazellulärer Raum und Neurone.

Abb. 19: EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER1.

Abb. 20: EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER1.

Abb. 21: Orientierungszeichnungen der Rekonstruktionen SER2 und SER3.

Abb. 22: 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER2: Neurone und Vitrea.

Abb. 23: 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER3: Neurone und Vitrea.

Abb. 24: 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER3: extrazellulärer Raum und Neurone.

Abb. 25: EM-Aufnahmen von inserierenden Filopodienstrukturen (SER2).

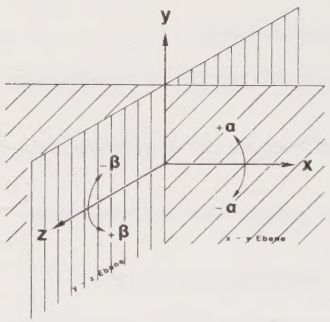
Abb. 26: EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER2.

Abb. 27: EM-Aufnahmem einzelner Schnittebenen aus SER3.

Abb. 28: EM-Aufnahmen an Einzelschnitten von 77-78 Stunden alten Wachtel-Retinae.

Hinweis zu den 3D-Computergrafiken:

Um für die Betrachtung und Auswertung günstige Positionen zu erreichen, konnten die 3D-Rekonstruktionen im Raum gedreht werden. Durch zwei aufeinanderfolgende Rotationen um zwei Achsen konnten - bis auf nicht relevante Extremwerte - alle Positionen dargestellt werden. Zuerst wurde das Bild um den Winkel α in der x-y-Ebene gedreht (in positiver oder negativer Richtung, wie in der Abbildung angegeben). Die zweite Drehung erfolgte um den Winkel β in der y-z-Ebene.



Somit wurde ein in der x-y-Ebene liegendes Bild zuerst um den Winkel α in der x-y-Ebene gedreht und darauf aus der x-y-Ebene heraus z.B. um die x-Achse nach vorn oder hinten um den Betrag des Winkels β gekippt.

In den Abbildungstexten zu den 3D-Computergrafiken wurde für die Rotation zuerst der Winkel α, dann die Drehung um β angegeben. Stereobilder differieren jeweils um 5° in der Drehung um β.

Als Vergrößerungsmaßstab ist jeweils in der rechten unteren Bildecke ein Kreis eingezeichnet, dessen Durchmesser 5 μm andeuten. Der Kreis wurde, entsprechend den Rotationen der Grafiken, ebenfalls gedreht. Die Lage von x- und y-Achsen, wie sie vor der Rotation waren, sind im Kreisinnnern eingezeichnet.

I. EINLEITUNG

Während der Embryogenese des Zentralen Nervensystems nehmen neuronale Zellen Kontakt mit anderen Nervenzellen auf, indem Axone aus den Zellen auswachsen und Synapsen mit bestimmten Zielzellen bilden. Das Ergebnis ist eine präzise und definierte Verknüpfung neuronaler Zellen untereinander, die hochkomplex ist und die erstaunlichen Leistungen eines Gehirns erst ermöglicht.

Da Axone auf dem Weg zu ihren Zielzellen selbst im Embryo teilweise erhebliche Entfernungen zurücklegen müssen, stellte sich schon bald die Frage, welche Faktoren die Wachstumsrichtung einer Nervenfaser beeinflussen. Bereits Ramòn y Cajal erkannte im Jahre 1890, daß die Spitze der Nervenfaser für das gerichtete Wachstum eine entscheidende Rolle spielt (Ramòn y Cajal, 1890). Jedoch erst 20 Jahre später wurde dieser Vorgang von Harrison beschrieben: er beobachtete lebende Wachstumskegel, i.e. die Spitzen von Nervenfasern, und deren Bewegungen in Zellkultur (Harrison, 1910). In den folgenden Jahrzehnten führten zahlreiche Versuche zu unterschiedlichen Theorien, wie gerichtetes Nervenfaserwachstum induziert werden könnte.

Eine der ältesten Vorstellungen über die Orientierung auswachsender Nervenfasern ist in der Theorie des Stereotropismus zusammengefaßt, wonach mechanische Faktoren die Richtung des Axons bestimmen. Paul Weiss stellte bei Zellkulturversuchen mit Neuronen fest, daß auswachsende Neurite Kratzern auf dem Boden der Kulturschalen folgten oder entlang den Falten einer gespannten Membran wuchsen (Weiss, 1934). Diese Beobachtungen veranlaßten viele Autoren zu Experimenten, um festzustellen, ob morphologische Strukturen in der Umgebung der auswachsenden Axone für ein gerichtetes Nervenfaserwachstum (mit)verantwortlich sein könnten. In-vitro-Versuche von Bray bestätigten, daß mechanische Spannung an Nervenfasern verstärktes, axonales Wachstum bewirken kann (Bray, 1984).

Morphologische Studien von Silver und seinen Mitarbeitern am Gehörorgan und an der Retina der Maus weisen auf ein extrazelluläres Kanalsystem hin, dessen Entstehung zeitlich und räumlich mit dem Tod bestimm-

ter Zellen korreliert ist und das als Leitsystem für die auswachsenden Fasern der Retina bzw. des Gehörorgans dienen sollte (Carney und Silver, 1983; Silver und Robb, 1979; Silver und Sidman, 1980).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Nordlander, Singer und Egar an wachsenden Axonen im Rückenmark von Xenopus zeigten ebenfalls orientierte extrazelluläre Räume, in die die Axone einwuchsen (Nordlander und Singer, 1982a,b; Singer et al., 1979). Die Autoren stellten die sogenannte "blueprint"-Hypothese auf, die besagt, daß durch das Neuroepithel der Weg für die Fasern vorgezeichnet wird, indem durch Gliazellen ein extrazelluläres Höhlen- und Kanalsystem gebildet wird (Singer et al., 1979).

Der Weg von Motoneuronen in den Hinterextremitäten des Hühnchenembryos scheint dagegen weder durch den direkten Kontakt der Fasern mit orientierten extrazellulären Fibrillen, benachbarten Mesenchymzellen, dem Myotom oder mit Blutgefäßen, noch durch bereits existierende extrazelluläre Kanäle bestimmt zu werden. Die Fasern wuchsen durch extrazelluläre Räume, die durch den Tod mesenchymaler Zellen vor der Wachstumsfront der Motoaxone entstanden (Tosney und Landmesser, 1985).

Orientierte extrazelluläre Kanäle in der embryonalen Hühnchen-Retina wurden von Krayanek und Goldberg (1981) in einem Entwicklungsstadium vor dem Auswachsen der ersten Ganglienzellfasern nachgewiesen. Die ersten Nervenfasern fanden sie dann in extrazellulären Räumen und schlossen daraus, daß die auswachsenden Axone durch die Ausrichtung der Kanäle zur optischen Fissur finden. In einer rasterelektronenmikroskopischen Studie wurden ebenfalls extrazelluläre Räume im vitrealen Teil der embryonalen Hühnchen-Retina, der späteren Opticus-Faserschicht, im selben vor-axonalen Stadium gefunden, jedoch keine Ausrichtung dieser Räume auf die optische Fissur hin (Suburo et al., 1979).

Anfang dieses Jahrhunderts hatten Zellkulturversuche von Ariëns-Kappers gezeigt, daß elektrische Felder ein gerichtetes Nervenfaserwachstum induzieren konnten (Ariëns-Kappers, 1917). Die von ihm entwickelte Galvanotropismus-Theorie fand durch verfeinerte Meßmethoden für elektrische Felder in neuerer Zeit wieder Interesse. Verschiedene Autoren konnten in in-vitro-Experimenten demonstrieren, daß Neurite

bevorzugt in die Richtung der Kathode wuchsen und die Wachstumsrate der Fasern im elektrischen Feld erhöht wurde (Jaffe und Poo, 1979; Patel et al., 1985).

Eine weitere Tropismus-Theorie beruht auf Versuchen, wie sie u.a. von Letourneau durchgeführt worden waren und die auf eine unterschiedliche Adhäsivität von Nervenfasern an bestimmte Substrate schließen lassen. Die auswachsenden Nervenfasern von Zellkulturneuronen wuchsen, wenn ihnen Alternativen angeboten wurden, bevorzugt auf den Substraten, auf denen sie besonders gut hafteten (Letourneau, 1975a,b).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen an wachsenden Axonen im Flügel der Motte Manduca sexta (Nardi, 1983; Nardi und Kafatos, 1976). Die Nervenfasern wachsen dort zwischen den zwei epithelialen Zellschichten, die die obere und untere Oberfläche des Flügels bilden. Die Fasern haben direkten Kontakt mit der Basallamina der oberen Epithelschicht. Werden Teile der Basallamina durch andersartige Transplantate ersetzt, meiden die Axone diese Transplantate. Werden jedoch Teile der Basallamina der unteren Epithelschicht ersetzt, bleibt dies ohne Auswirkung auf die Wachstumsrichtung der Nervenfasern. Offensichtlich sind auf der Basallamina der oberen Epithelschicht Informationen für die Wachstumsrichtung der Axone in Form eines Adhäsivitätsgradienten vorhanden. Ähnliche Gradienten vermuten auch andere Autoren als Ursache für das Richtungswachstum von Axonen (Berlot und Goodman, 1984; Caudy und Bentley, 1986; Gundersen und Barrett, 1984). Direkter Kontakt mit der Basallamina des Rückenmarks wurde auch bei auswachsenden Neuriten in Xenopus-Embryonen gefunden (Roberts und Patton, 1985).

Die Entdeckung einer diffusiblen Substanz durch Rita Levi-Montalcini und Victor Hamburger (1953), von NGF (**N**erve **G**rowth **F**actor), welche Nervenfasern in Kultur zu einem verstärkten und zielgerichteten Wachstum veranlaßte, führte zu der Vorstellung, daß das Zielgewebe eine Substanz in die Umgebung abgibt und damit ein Gradient aufgebaut wird; wachsende Axone würden dann, einer steigenden Konzentration folgend, zum Zielgewebe finden (Chemotropismus). Es folgten viele weitere Untersuchungen, die zeigten, daß NGF für das Wachstum bestimmter Nervenfasern notwendig war und den chemotropen Effekt von NGF bestätigten (z.B. Gundersen, 1985; Gundersen und Barrett, 1980; Letourneau, 1978).

Wie auswachsende Nervenfasern ihre Zielzellen finden läßt sich besonders gut am retinotectalen System studieren. Die Retina ist morphogenetisch ein Teil des Zentralen Nervensystems (ZNS). Retinale Ganglienzellen müssen während ihrer Entwicklung Verbindung mit Zellen des optischen Tectums, einem Teil des Mesencephalons, aufnehmen. Dazu müssen die Ganglienzellaxone in der Retina zur optischen Fissur finden und durch den optischen Stiel zu ihren meist in der contralateralen Hälfte des optischen Tectums gelegenen Zielzellen wachsen; Projektionen zur ipsilateralen Hälfte des Tectum opticum und zur contralateralen Retina werden ebenfalls aufgebaut. Eine äußerst präzise topografische Projektion retinaler Axone zu tectalen Zielzellen entsteht während der Entwicklung des Gehirns. Durch Experimente am retinotectalen wie auch an anderen Systemen (wie z.B. dem neuromuskulären System) entwickelten sich im Laufe der Jahre Vorstellungen, wie Axone ihre Zielzellen finden könnten.

Eine Hypothese, die in den 40-er Jahren allgemein akzeptiert und von Weiss favorisiert wurde, ist die sogenannte Resonanz-Hypothese. Dieser liegt die Vorstellung zugrunde, daß Zielgewebe nicht über präzise Punkt-zu-Punkt-Verknüpfungen innerviert werden. Die Verschaltung erfolgt eher diffus; die einzelne Zielzelle wird nur durch das für sie geeignete Aktivitätsmuster eines Axons aus einem gewissen Entstehungsbereich angesprochen. Aktivitätsmuster anderer Axone werden ignoriert (Weiss, 1924).

Sperry wies durch seine Experimente an Fröschen nach, daß die Resonanz-Hypothese zumindest in dieser Form nicht haltbar war. Verhaltensversuche an Fröschen, bei denen die Augen operativ um 180° gedreht worden waren, zeigten, daß nach Regeneration der Axone sich auch die optische Welt der Tiere gedreht hatte. Dies bedeutete, daß regenerierende Axone wieder in ihr ursprüngliches Zielgebiet einwuchsen. Die Signale, die die tectalen Zielzellen nach der Operation erhielten, stammten jedoch aus anderen, neu innervierten Retinaarealen, so daß der Frosch eine Fliege, die er im rechten Gesichtsfeld erblickte, durch einen Sprung nach links fangen wollte. Die Rückschlüsse aus diesen und weiteren Experimenten faßte Sperry in seiner sogenannten Chemmoaffinitätshypothese zusammen: ein Neuron ist durch seine biochemische Ausstattung von anderen Neuronen unterscheidbar und wird dadurch

von seiner Zielzelle erkannt; die Verknüpfung von Axon und Zielzelle kommt durch eine selektive, chemische Affinität zustande (Sperry, 1963).

Die Idee der Chemoaffinität führte zu einer Reihe von Experimenten, die unter anderem spezifische Zelladhäsion im retinotectalen System nachweisen konnten (Bastiani et al., 1985; Bonhoeffer und Huf, 1985; Halfter et al., 1981). Von großem Interesse ist dabei die Entdeckung eines Antikörpers, der gegen ein in der Retina gradiiert verteiltes Molekül gerichtet ist (Trisler et al., 1981), und die Entdeckung eines Zelladhäsionsmoleküls (**c**ell **a**dhesion **m**olecule, CAM), wie es von Edelman und seinen Mitarbeitern beschrieben wurde (Edelman, 1983). Weitere Tests mit CAM zeigten, daß es bei der retinalen Zelladhäsion eine Rolle spielt und wurde deshalb N-CAM (nerve cell adhesion molecule) genannt. Wurden Nervenfasern in der embryonalen Hühnchen-Retina mit einem Antikörper gegen N-CAM behandelt, verursachte dies Störungen in der Faszikulation der auswachsenden Axone (Thanos et al., 1984).

Die von Raper, Bastiani und Goodman postulierte "labeled-pathway"-Hypothese beruht auf den Prinzipien von Sperry's Chemoaffinitätshypothese: auswachsende Nervenfasern finden auf bestimmten, bereits vorhandenen Axonen Moleküle, die sie veranlassen, an diesen Axonen entlangzuwachsen (Bastiani et al., 1984, 1985; Raper et al., 1983a,b, 1984).

Die von Paul Weiss entwickelte "contact-guidance"-Hypothese kommt dagegen ohne jegliche chemische Marker aus (Weiss, 1934). Nach den Beobachtungen von Weiss konnte die Wachstumsrichtung von Axonen in Zellkultur z.B. durch Kratzer auf dem Boden von Kulturschalen bestimmt werden (siehe auch "Stereotropismus"). Axone konnten demnach ihr Zielgewebe erreichen, indem sie mechanischen Leitstrukturen in ihrer Nachbarschaft folgten.

Ob die contact-guidance-Hypothese mit ihren morphologischen Leitstrukturen eine ausreichende Erklärung für die präzise Verschaltung von Nervenzellen bietet, ob für das zielgerichtete Wachstum der Axone chemische Marker notwendig sind wie in der labeled-pathway-Hypothese von Raper et al. (1983a,b) postuliert, ob eine besondere chemische Affinität zwischen dem auswachsenden Axon und seiner Zielzelle besteht

(Sperry, 1963) oder ob gradierte Verteilung bestimmter Moleküle, vom Zielgewebe produziert und abgesondert, eine Rolle spielen könnte, ist bis heute nicht geklärt. Gut vorstellbar ist auch, daß mehrere Faktoren für das Richtungswachstum der Axone wichtig sind, abhängig z.B. vom Entwicklungsstadium oder der augenblicklichen Entfernung der Axonspitze, dem Wachstumskegel (engl. growth cone) von der Zielzelle. Daß der Wachstumskegel für das zielgerichtete Wachstum eine wichtige, wenn nicht die entscheidende Rolle spielt, wird zur Zeit kaum angezweifelt (sh. auch Reviews von Constantine-Paton, 1979; Landis, 1983; Letourneau, 1983; Solomon, 1981).

Erstaunlicherweise ist über die morphologische Feinstruktur von Nervenfasern und den von ihnen durchquerten Geweben sehr wenig bekannt, obwohl sich daraus wichtige Aussagen über die axonale Navigation ableiten ließen. Dies war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Sind morphologische Strukturen vorhanden, die den Axonen als Leitsystem zur optischen Fissur dienen könnten?

- Haben die auswachsenden Fasern direkten Kontakt mit der vitrealen Basallamina der Retina?

- Spielen Axon-Axon-Wechselwirkungen für die Wachstumsrichtung eine Rolle?

- Ergeben sich, wie es von anderen Autoren nachgewiesen wurde (Caudy und Bentley, 1986; Harris et al., 1985; Roberts und Taylor, 1983; Tosney und Landmesser, 1985), aus der Ultrastruktur der Wachstumskegel und deren Filopodien Hinweise auf die Affinität zum umgebenden Substrat?

An der Retina und der sich entwickelnden retinotectalen Projektion lassen sich solche Fragen sehr gut klären, da die Retina in allen Stadien ihrer Embryonalentwicklung experimentell leicht zugänglich ist und aufgrund ihrer Schichtung die interessierenden Zelltypen gut lokalisierbar sind. Zudem dürfte das retinotectale System eines der bestuntersuchtesten neuronalen Systeme sein, wodurch eine Fülle von Daten zur Verfügung stehen.

Eine grundlegende Voraussetzung, um Aussagen uber die dreidimensionale Struktur von Zellen und Geweben machen zu können, ist die Erhaltung der in-vivo-Verhältnisse im Gewebe während der Präparationsschritte, die für die elektronenmikroskopische Untersuchung notwendig sind. Auf die Zusammensetzung und Osmolarität der Lösungen, mit denen das Gewebe in Berührung kommt, muß dabei besonders geachtet werden, da embryonales Nervengewebe sehr empfindlich auf Pufferlösungen mit ungeeigneten osmotischen Werten reagiert (Meißner, 1983). Die Fixierungsmethode ist ebenfalls wichtig: embryonale Nervenfasern reagieren sehr empfindlich auf mechanischen Streß, was vor der mechanischen Präparation (z.B. Herauspräparieren der Augen) eine Perfusionsfixierung notwendig macht (Meißner, 1983; Stensaas, 1972). Für die Strukturerhaltung kritische Präparationsschritte sind u.a. die chemische Fixierung des Gewebes und die Entwässerung. Eine äußerst schonende Methode hierfür ist die Gefrierfixierung und die Gefriersubstitution (sh. auch Reviews von Harvey, 1982; Plattner und Bachmann, 1982).

Diese Cryomethoden ermöglichen (1) eine Entwässerung an mechanisch stabilisiertem Gewebe, (2) den Transport der Fixierungsmittel zu ihrem Wirkungsort im inaktivierten Zustand bei tiefen Temperaturen, (3) die Aktivierung von Fixierungsmitteln am Wirkungsort durch geeignete Temperaturerhöhung und (4) eine chemische Fixierung bei tiefer Temperatur (sh. Abb. 1). Die Extraktion von Zellmaterial wird dadurch verringert und die Ultrastrukturerhaltung entscheidend verbessert (Benshalom und Reese, 1985; Humbel, 1984; McKerracher und Heath, 1985; Rees und Reese, 1981; Verna, 1983).

Bei der Gefrierfixierung von biologischem Material muß die Kristallisation des Zellwassers vermieden werden, da Eiskristalle die Zellstruktur zerstören. Bei kleinen Proben (unter 10 μm Kantenlänge) ist es möglich, durch sehr schnelles Abkühlen mit geeigneten Kühlmitteln sowie entsprechenden Gefrierfixierungsmethoden mikrokristalline Eisstrukturen zu erhalten, die so geringe Gefrierfixierungsartefakte verursachen, daß sie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung nicht sichtbar sind. Die Physik des Gefrierens, die physikalischen Eigenschaften von Kühlmitteln und verschiedene Gefriermethoden sind von Robards und Sleytr (1985) und Plattner und Bachmann (1982) beschrie-

ben.

Die Gefrierfixierung von größeren Gewebeverbänden bereitet jedoch Schwierigkeiten, da eine mikrokristalline Struktur des Zellwassers selbst unter optimalen Gefrierfixierungsbedingungen nur bis in eine Gewebstiefe von maximal 10 µm erreicht werden kann (Abb. 9) (Verna, 1983; Völker et al., 1984). Deshalb läßt sich eine Behandlung des Gewebes mit Gefrierschutzmitteln nicht vermeiden. Die Eignung von Gefrierschutzmitteln für die Gefrierfixierung von biologischem Material wurde von verschiedenen Autoren unter den unterschiedlichsten Blickwinkeln betrachtet (Barnard, 1980; McGann, 1978; Moor, 1964; Niedermeyer et al., 1977; Richter, 1968a,b; Schiller und Taugner, 1980; Williams und Harris, 1977). Systematische Untersuchungen über die Erhaltung der Gewebestruktur mit verschiedenen Gefrierschutzmitteln vor allem an embryonalem Nervengewebe liegen nur wenige vor (Cheng und Reese, 1985; Moor et al., 1980). Dies soll mit eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Chemikalien und Lösungen.

1.1. Chemikalien.

Es wurden folgende Chemikalien verwendet:

Aceton, Art.-Nr. 14, Fa. Merck, Darmstadt;
Äthylenglycol, Art.-Nr. 33068, Fa. Riedel-De Haën, Seelze;
Bleicitrat, Art.-Nr. 15158, Fa. Serva, Heidelberg;
Calciumchlorid, Art.-Nr. 31214, Fa. Riedel-De Haën, Seelze;
Dextran (MG 40.000), Art.-Nr. D 4133, Fa. Sigma, St. Louis/USA;
1,2-Dichloräthan, Art.-Nr. 953, Fa. Merck, Darmstadt;
Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, Art.-Nr. 820670, Fa. Merck, Darmstadt;
N,N-Dimethylformamid, Art.-Nr. 3053, Fa. Merck, Darmstadt;
Dimethylsulfoxid, Art.-Nr. 2931, Fa. Merck, Darmstadt;
1,4-Dioxan, Art.-Nr. 3110, Fa. Merck, Darmstadt;
Formvar 1595 E, Art.-Nr. FO 6044, Fa. Schuchardt, München;
Glutaraldehyd, Grade I, 25% wässrige Lösung, Art.-Nr. G 5882, Fa. Sigma, St. Louis/USA;
Glutaraldehyd, puriss., 50% wässrige Lösung, Art.-Nr. 49628, Fa. Fluka, Buchs/Schweiz;
Glycerin, Art.-Nr. 4096, Fa. Merck, Darmstadt;
Glycidether 100, Art.-Nr. 2-8619, Fa. Roth, Karlsruhe;
Glycidether 100 Härter DBA, Art.-Nr. 2-8623, Fa. Roth, Karlsruhe;
Glycidether 100 Härter MNA, Art.-Nr. 2-8639, Fa. Roth, Karlsruhe;
Glycidether 100 Beschleuniger DMP-30, Art.-Nr. 2-8621, Fa. Roth, Karlsruhe;
Methanol, Art.-Nr. 6009, Fa. Merck, Darmstadt;
Molekularsieb, 3 A Perlform, Art.-Nr. 31811, Fa. Riedel-De Haën, Seelze;
Natriumhydroxid, Art.-Nr. 6495, Fa. Merck, Darmstadt;
Osmiumtetroxid, Kat.-Nr. O 001, Fa. Hert, München;
Paraformaldehyd, Art.-Nr. 4005, Fa. Merck, Darmstadt;

Pioloform F, Fa. Wacker-Chemie, Burghausen;
Polyvinylpyrrolidon (MG 25.000-30.000), Art.-Nr. 7443, Fa. Merck, Darmstadt;
Rutheniumrot, Art.-Nr. 84071, Fa. Fluka, Buchs/Schweiz;
Salzsäure, Art.-Nr. 317, Fa. Merck, Darmstadt;
Uranylacetat, puriss. p.a., Art.-Nr. 94260, Fa. Fluka, Buchs/Schweiz.

1.2. Lösungen.

Natrium-Cacodylatpuffer-Stammlösung: eine 250 mM Lösung wurde mit Salzsäure auf pH 7,2-7,3 eingestellt und die Osmolarität mit der Gefrierpunkterniedrigungs-Methode (Osmometer der Fa. Knauer) bestimmt.

Stammlösungen für Substitutionslösung:

1. Methanolische RR-GA-Stammlösung: eine Spatelspitze Rutheniumrot (RR) wurde in Methanol, das über Molekularsieb getrocknet worden war, über mehrere Tage bei Raumtemperatur gelöst. Danach wurde die leicht violettfarbene Lösung filtriert (Einmalfilter FP 030/2, 0,45 µm, Fa. Schleicher & Schüll). Im Filtrat wurden 3% GA (Fa. Fluka) gelöst und bei -70°C aufbewahrt.
2. Methanolische OsO_4-Stammlösung: in Methanol, das über Molekularsieb getrocknet worden war, wurden 6% OsO_4 gelöst und ebenfalls bei -70°C aufbewahrt.

Beide Stammlösungen konnten so über Monate gelagert werden.

Substitutionslösung: Vor Gebrauch wurden 5 Teile der methanolischen RR-GA-Stammlösung bei -90°C (in der Substitutionskammer) mit 1 Teil der methanolischen Osmium-Stammlösung gemischt, so daß die fertige Substitutionslösung 2,5% GA und 1% OsO_4 in RR-haltigem Methanol enthielt. Der Wassergehalt lag bei 2,5-3%.

Pufferlösungen für Vorfixierung und Gefrierschutzmittel-Inkubation: siehe Tab. 1.

Epon-Mischungen für Kunstharz-Einbettungen:

1. "Epon I": 38,3% Glycidether 100[1]) und 61,7% Harter DBA wurden gemischt.
2. "Epon II": 52,9% Glycidether 100[1]) und 47,1% Härter MNA wurden gemischt.

Vor Gebrauch wurden 3 Teile Epon I und 7 Teile Epon II gut gemischt , bis beim Rühren keine Schlieren mehr erkennbar waren, dann wurden 1,5% Beschleuniger DPM-30 zugegeben.

[1])Glycidether 100 wurde zuvor im Vakuumschrank entlüftet.

Lösungen für die Befilmung von Trägernetzchen: In Dioxan bzw. Dichloräthan wurden 1,5% (w/v) Pioloform F oder Formvar gelöst, bis beim Schütteln keine Schlieren mehr sichtbar wurden. Die Lösungen wurden im Dunkeln in Braunglasflaschen aufbewahrt.

Kontrastierungslösungen für Ultradünnschnitte:

1. Ultrostain 1 (stabilisierte Uranylacetatlösung unbekannter Zusammensetzung), Best.-Nr. 90013710, Fa. LKB, Bromma/Schweden.
2. Ultrostain 2 (stabilisierte Bleicitratlösung unbekannter Zusammensetzung), Best.-Nr. 90013711, Fa. LKB, Bromma/Schweden.
3. 0,05% Bleicitratlösung (w/v): 0,1 g Bleicitrat wurden in 50 ml CO_2-armes Aqua bidest. gegeben, 0,5 ml 10 N NaOH tropfenweise zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Lösung wurde 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.
4. 10% Uranylacetatlösung (w/v): 3 g Uranylacetat wurden in 30 ml 70%igem Methanol gelöst und filtriert.

2. Inkubation, Perfusionsfixierung und Präparation der Embryonen.

Alle Untersuchungen wurden an frühembryonalem Nervengewebe von Hühnchen und Wachteln (Embryonaltag 2,5 bis 4) durchgeführt. Befruchtete Wachteleier wurden im Brutschrank bei ca. 38°C und feuchter Atmosphäre inkubiert und nach 55-60 Std. in Anlehnung an die Methode von Auerbach et al. (1974) in Petrischalen kultiviert. Anschließend wurden die Embryonen nach der Methode von Meißner (1983) perfusionsfixiert. Dabei wurde das Blut zuerst mit Waschpuffer aus dem Blutgefäßsystem gespült,

dann wurden die Embryonen mit Fixierpuffer perfundiert. Nach ca. 5 min wurde der Kopf abgetrennt und für weitere 30 min im Fixierpuffer belassen; anschließend wurden die Retinae herauspräpariert. Die Zusammensetzung und osmotischen Werte der einzelnen Puffer ist in Tabelle I zusammengefaßt. Alle Puffer wurden aus einer Na-Cacodylatpuffer-Stammlösung (250 mM; 500 mosm; pH 7,25 mit HCl eingestellt) hergestellt. Formaldehyd (FA) wurde wie in Glauert (1974) beschrieben jeweils vor dem Versuch frisch angesetzt. Zehn Prozent der meßbaren Aldehyd-Osmolarität wurden jeweils aufgrund der Versuchsergebnisse von Meißner (1983) im Fixierpuffer bei der Berechnung des effektiven osmotischen Drucks berücksichtigt.

3. Gefrierfixierung und Gefriersubstitution.

3.1. Test verschiedener Gefrierschutzmittel.

Die Embryonen wurden mit Waschpuffer I und Fixierpuffer I (Tab. I) perfundiert. Die Puffer hatten einen effektiven osmotischen Druck von ca. 280 mosm. Erste Versuche sollten zeigen, welche Konzentrationen der verschiedenen Gefrierschutzmittel erforderlich waren, um einen ausreichenden Gefrierschutz für das Gewebe zu erreichen: die Proben wurden nach der Perfusion 3 Std. in Fixierpuffern inkubiert, die in ihrer Zusammensetzung den Fixierpuffern II bis VII in Tab. I entsprachen. Zusätzlich wurden 5 und 15%-ige Konzentrationen des jeweiligen Gefrierschutzmittels getestet.

Untersucht wurden hochmolekulare, nichtpenetrierende Substanzen wie PVP und Dextran sowie niedermolekulare, penetrierende wie Glycerin, Äthylenglycol, DMSO und DMF. Die osmotischen Werte aller getesteten Gefrierschutzmittel wurden in der Berechnung des effektiven osmotischen Drucks der Puffer nicht berücksichtigt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Inkubationszeit im Gefrierschutzmittel variiert. Nach Vorfixierung und Präparation (Gesamtdauer 40-60 min) kamen die Proben - mit Ausnahme der Kontrollen ohne Ge-

frierschutzmittel - für 3 Std. bzw. 30-60 min in Fixierpuffer, der zusätzlich 25-30% Gefrierschutzmittel enthielt (Fixierpuffer II bis VII).

Nach der Inkubation in Gefrierschutzmittel wurden die Proben in -185°C kaltem Propan gefrierfixiert und anschließend gefriersubstituiert. Die Methode der Gefriersubstitution beruhte auf den Ergebnissen von Gefriersubstitutionsversuchen, wie sie von Humbel (1984), Humbel und Müller (1984) und Humbel et al. (1983) durchgeführt worden waren. Der Aufbau der Substitutionsapparatur entsprach im Prinzip der von Müller et al. (1980). Wir verwendeten eine von uns modifizierte Version.

Zur Gefrierfixierung wurden die präparierten Retinae auf Ösen aus 0,15 mm dickem Stahldraht aufgenommen und in das gekühlte Propan getaucht. Der Innendurchmesser der Ösen war etwas kleiner als der Durchmesser einer Retina, so daß diese beim Aufnehmen in der Öse liegenblieb. Die Kälte konnte dabei aus scleraler Richtung auf das Gewebe einwirken. Die Masse des Probenträgers Öse war hinreichend klein, so daß eine schnelle Abkühlung erreicht werden konnte. Das Einschießen der Proben mit Hilfe einer Apparatur brachte bei gefriergeschütztem Gewebe keine sichtbare Verbesserung der Ergebnisse. Nach der Gefrierfixierung kamen die Retinae in die Substitutionslösung (siehe Abschnitt 1.2.), die in der Substitutionskammer auf -90°C vorgekühlt worden war, und durchliefen ein Substitutionsprogramm, wie es von Müller et al. (1980) vorgeschlagen worden war. Dieser Verlauf ist in Abb. 1 im Vergleich zur konventionellen EM-Präparation bei Raumtemperatur schematisch dargestellt.

Nach der Gefriersubstitution wurden die Proben bei Raumtemperatur mehrmals in abs. Methanol gewaschen, dann in abs. Aceton überführt und nach mehrmaligem Wechsel mit einer Aceton-Epon-Mischung (1:1) infiltriert. Durch einen konstanten Luftzug über den Probenröhrchen verdampfte das restliche Aceton aus der Mischung und im Gewebe wurde eine kontinuierliche Infiltration mit Epon erreicht. Nach mehreren Wechseln in reinem Epon wurden die Proben eingebettet, dann wurde das Kunstharz bei 60°C auspolymerisiert.

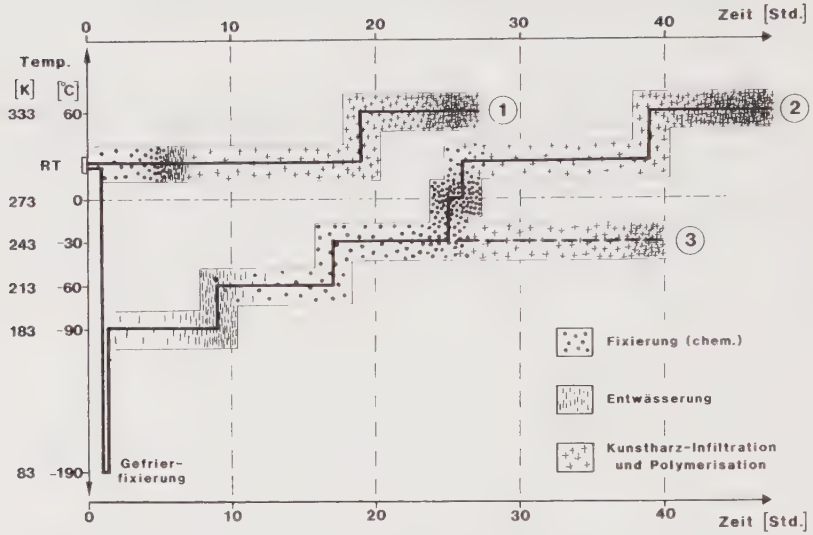


Abb. 1. Präparationsschema für Gefriersubstitution und konventionelle Einbettung bei Raumtemperatur. In der konventionellen Einbettung bei Raumtemperatur (1) erfolgt die chemische Fixierung vor der Entwässerung. Durch die teilweise langen Penetrationszeiten der Fixierungslösungen müssen Ultrastrukturveränderungen und Extraktion von Zellmaterial in Kauf genommen werden. In der Gefriersubstitution erfolgt die chemische Fixierung nach der Entwässerung bei -90°C. Durch Erhöhung der Temperatur werden die einzelnen Fixantien, die im Entwässerungsmittel (z.B. Methanol) bereits enthalten sind und mit diesem im Gewebe verteilt wurden, aktiviert. Da die Penetration des Gewebes mit der Substitutionslösung bei tiefer Temperatur erfolgt, ist die Gefahr von strukturellen Veränderungen im Gewebe wesentlich verringert. Der Gefriersubstitution kann eine konventionelle Epoxidharz-Einbettung (2) oder eine Lowicryl-Tieftemperatureinbettung (3) folgen.

3.2. Test verschiedener Bedingungen für Vorfixierung und Inkubation in Gefrierschutzmittel.

Substanzen wie DMSO werden Fixierungslösungen zugesetzt, um die Penetrationsgeschwindigkeit des Fixativs zu erhöhen (Favre und Sans, 1983; Kalt und Tandler, 1971). FA wiederum dringt schneller in das Gewebe ein als GA, weshalb oft Aldehyd-Mischungen in Fixierungslösungen verwendet werden, um sich sowohl die Vorteile der besseren Fixierungswirkung von GA als auch die höhere Penetrationsgeschwindigkeit von FA

zunutze zu machen (siehe auch Hayat (1981), S. 97f, 110f). Aus diesen Gründen wurden Proben

(1) zuerst mit Fixierpuffer VIII bzw. XI (mit 2,5% GA bzw. 2% FA + 0,5% GA) in insgesamt 40 min vorfixiert und anschließend für weitere 20-30 min in Fixierpuffer IX oder X bzw. XII oder XIII, der zusätzlich als Gefrierschutzmittel DMSO bzw. DMF enthielt, inkubiert oder

(2) bereits mit Fixierpuffer IX oder X bzw. XII oder XIII perfundiert und für insgesamt 40 min vorfixiert.

Die Zusammensetzungen und osmotischen Werte der Puffer sind in Tabelle I beschrieben. Gefrierfixierung, Gefriersubstitution und Epon-Einbettung wurden wie in Abschnitt 3.1. beschrieben durchgeführt.

Tabelle I

Puffer	Zusammensetzung	Osmolarität der Pufferkomp., osmometrisch meßbar [mosm]	osmotisch wirksam [mosm]	AOP bzw. EOP [mosm]
Wasch I	Na-Cacod. 134 mM $CaCl_2$ 4 mM PVP 2%(w/v)	268 8 13	268 8 -	276
Fix I	Na-Cacod. 110 mM $CaCl_2$ 4 mM PVP 2%(w/v) FA 2%(v/v)	220 8 13 480	220 8 - 48 [1]	276
Fix II	dto. +PVP 25%(w/v)		276 -	276
Fix III	dto. +Dex 25%(w/v)		276 -	276
Fix IV	dto. +Gly 30%(v/v)		276 -	276
Fix V	dto. +ÄGl 30%(v/v)		276 -	276
Fix VI	dto. +DMSO 30%(v/v)		276 -	276
Fix VII	dto. +DMF 30%(v/v)		276 -	276
Fix VIII	Na-Cacod. 115 mM $CaCl_2$ 4 mM PVP 2%(w/v) GA 2,5%(v/v)	230 8 13 360	230 8 - 36 [1]	274
Fix IX	dto. +DMSO 30%(v/v)		274 -	274
Fix X	dto. +DMF 30%(v/v)		274 -	274
Fix XI	Na-Cacod. 105 mM $CaCl_2$ 4 mM PVP 2%(w/v) GA 0,5%(v/v) FA 2%(v/v)	210 8 13 72 480	210 8 - 7 [1] 48 [1]	273
Fix XII	dto. +DMSO 30%(v/v)		273 -	273
Fix XIII	dto. +DMF 30%(v/v)		273 -	273
Fix XIV	Na-Cacod. 102 mM $CaCl_2$ 4 mM PVP 2%(w/v) GA 1%(v/v) FA 2%(v/v)	204 8 13 145 480	204 8 - 15 [1] 48 [1]	275
Fix XV	dto. +DMF 30%(v/v)		275 -	275

Tab. I. Zusammensetzung und Osmolarität der Puffer zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Vorfixierung und die Verwendung von Gefrierschutzmitteln. Die Osmolarität nichtpenetrierender Zusätze wie PVP und der als Gefrierschutzmittel verwendeten Substanzen wurde bei der Berechnung der Gesamtosmolarität des Puffers nicht berücksichtigt. Abkürzungen: Dex = Dextran, Gly = Glycerin, ÄGl = Äthylenglycol (andere Abkürzungen siehe Text).

[1] 10% der meßbaren Aldehyd-Osmolarität wurden jeweils bei der Berechnung des gesamten osmotischen Drucks des Fixierpuffers berücksichtigt.

4. Präparation von Retinae für Schnittserien.

Die Substitutionsversuche, wie sie in den Abschnitten 3.1. und 3.2. beschrieben worden sind, führten zu einer ausgezeichneten Erhaltung von Gewebeultrastrukturen. Diese Präparationsbedingungen wurden - etwas modifiziert - für Embryonen verwendet, mit deren Retinae später Schnittserien und dreidimensionale Geweberekonstruktionen hergestellt wurden.

Embryonen wurden folgendermaßen präpariert:

(1) Perfusion mit Fixierpuffer XIV, Vorfixierung und Präparation der Retinae im selben Fixierpuffer für insgesamt 40 min, anschließend in Fixierpuffer XV (entspricht Fixierpuffer XIV, jedoch mit 30% DMF) für weitere 20-30 min. Darauf folgten Gefrierfixierung, Gefriersubstitution und Epon-Einbettung wie in Abschnitt 3.1. beschrieben oder

(2) Perfusion bereits mit Fixierpuffer XV, Vorfixierung und Präparation im selben Fixierpuffer für insgesamt 40 min. Anschließende Gefrierfixierung, Gefriersubstitution und Epon-Einbettung erfolgten ebenfalls wie in Abschnitt 3.1. beschrieben.

Retinae, die später für Schnittserien verwendet werden sollten, mußten während der Epon-Einbettung eine bestimmte Orientierung erhalten. Für diesen Zweck wurde eine ca. 5 mm hohen Eponschicht in Petriperm-Schalen ausgegossen und auspolymerisiert. Danach wurden 2-3 mm tiefe Löcher (Durchmesser 2 mm) in die Eponschicht gebohrt, in die die Proben gelegt wurden und in denen sie genau orientiert werden konnten. Das auspolymerisierte Epon wurde darauf nochmals mit einer dünnen Eponschicht übergossen, so daß die Bohrlöcher gefüllt und die Proben damit überschichtet waren. Die Retinae veränderten dadurch, daß sie in den Vertiefungen lagen, während des Transports der Schalen in den Wärmeschrank und während der Epon-Polymerisation ihre Position nicht mehr.

5. Trimmen und Schneiden.

Die Eponblöcke wurden mit einem LKB Pyramitome getrimmt, so daß eine Parallelogramm-förmige Anschnittfläche entstand. Durch die Positionierung der Proben während der Einbettung und die Orientierung der Eponblöcke beim Trimmen lag die Anschnittfläche in der Retinaregion in der Verlängerung der optischen Fissur nahezu rechtwinklig (±10°) zur Basallamina und zur optischen Fissur. Ultradünnschnitte wurden mit Diamantmessern an einem LKB Ultrotome IV hergestellt. Die Form der Pyramide beim Trimmen und die Schneidemethoden am Ultramikrotom unterschieden sich, abhängig davon, ob Einzelschnitte oder Schnittserien angefertigt werden sollten.

5.1. Einzelschnitte.

Beim Trimmen von Eponblöcken für Einzelschnitte spielten Hangneigung der Pyramidenseiten und Größe der Anschnittfläche keine entscheidende Rolle. Die Schnitte am Ultramikrotom zeigten im Wassertrog des Diamantmessers silberne Interferenzfarben und wurden direkt von der Wasseroberfläche auf befilmte und kohlebedampfte Kupfernetzchen aufgenommen.

5.2. Serienschnitt-Technik.

5.2.1. Trimmen.

Bereits beim Trimmen der Eponblöcke mußte darauf geachtet werden, daß später möglichst viele Schnitte auf ein Grid paßten, und somit möglichst wenig Grids pro Schnittserie notwendig waren. Aus diesen Gründen mußte (1) die Anschnittfläche so klein wie möglich gehalten werden, um von vornherein mehr Schnitte auf ein Grid legen zu können und (2) die Hangneigung der Pyramidenseiten so steil wie möglich gehalten werden, damit die Schittflächenzunahme gering blieb. So konnten bei langen Schnittserien auch gegen Ende der Serie noch relativ viele

Schnitte auf ein Grid gelegt werden.

Die Höhe der Parallelogramm-förmigen Anschnittfläche war durch die Dicke der Retina vorgegeben; sie betrug ca. 100 µm. Die Breite der Anschnittfläche wurde auf maximal 200 µm beschränkt. Wurde die Länge der parallelen Kanten erhöht, wuchs erfahrungsgemäß die Gefahr der Schnittkompression mit zunehmender Länge der parallelen Kanten. Zudem erwiesen sich Schnittbänder, bei denen die parallelen Kanten der Schnitte gleich lang bis doppelt so lang wie die Höhe waren, beim Übertragungsvorgang als besonders stabil. Für stabile Schnittbänder waren jedoch in erster Linie exakt parallele, gerade und glatte Ober- und Unterkanten der Anschnittflächen verantwortlich, so daß hinreichender Kontakt zwischen den aufeinanderfolgenden Schnitten bestand und die Verwendung von Haftzement, wie es von Henry (1977) beschrieben wurde, überflüssig war. Die Hangneigung der Pyramiden betrug 45°. Erfahrungsgemäß blieb damit die Schnittflächenzunahme innerhalb einer Schnittserie relativ gering und die Pyramide selbst war stabil genug, so daß es während des Schneidevorgangs nicht zu Vibrationen durch eine zu spitz getrimmte Pyramide kommen konnte.

5.2.2. Schneiden und Übertragen.

Am Ultramikrotom wurden Schnittbänder hergestellt, die in ihrer Länge problemlos in die freie Fläche eines Schlitzlochgrids (single slot grids, 1 mm x 2 mm) paßten. Die Schnittdicke lag in der Größenordnung der kleinsten, interessierenden Strukturen (Rieder, 1981), in diesem Fall also bei 100 nm, dem kleinsten Durchmesser von Filopodien. Die Schnittbänder wurden indirekt, wie in einer Methode von Gay und Anderson (1954) im Prinzip beschrieben und in einer modifizierten Form von Stevens et al. (1980) verwendet, auf befilmte Schlitzlochgrids übertragen.

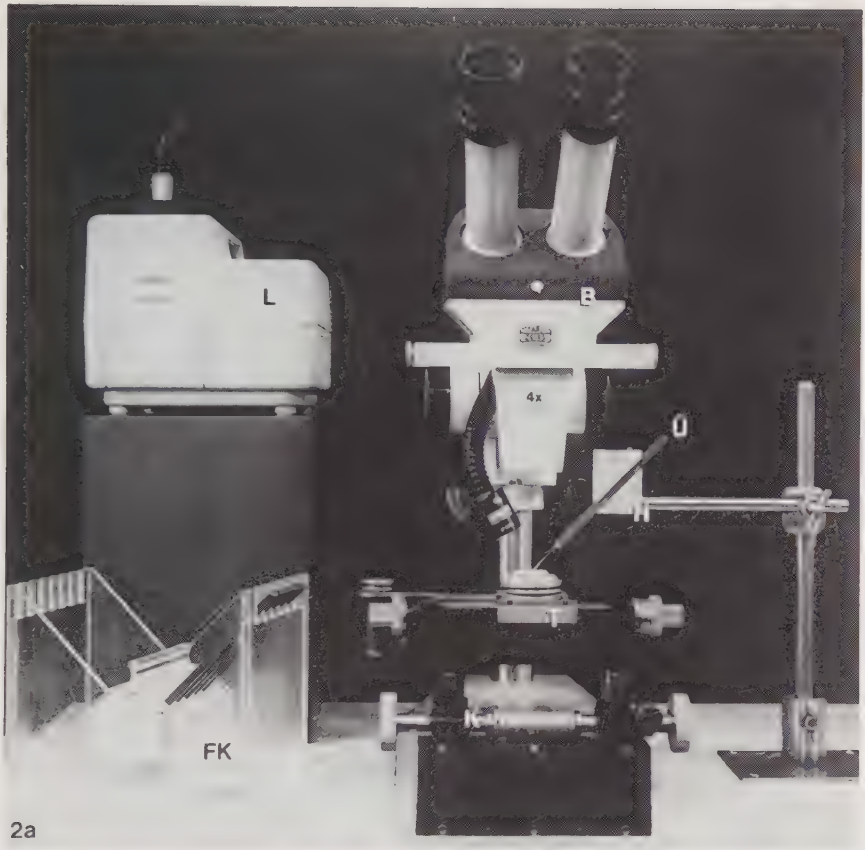
In einem ersten Schritt wurden die Schnittbänder aus dem Wassertrog des Diamantmessers mit unbefilmten, sogenannten Überträger-Grids (Abb. 2c) von der Wasseroberfläche aufgenommen, so daß die Bänder nach der Aufnahme auf einem Wassertropfen schwammen, der sich im Schlitz des Überträger-Grids befand. Dieser Tropfen hielt sich mehrere Stunden, wenn die Grids in die feuchte Atmosphäre einer Kammer (Abb. 2b) gebracht wurden. Somit konnte eine Schnittserie am Ultramikrotom zu Ende

geführt werden ehe die Schnittbänder auf befilmte Grids übertragen wurden.

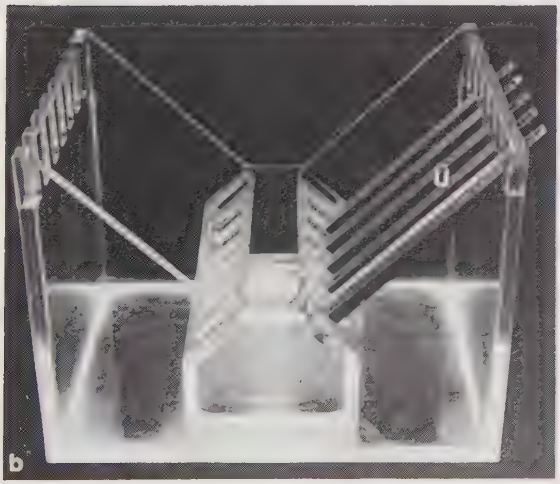
In einem zweiten Schritt wurden die einzelnen Schnittbänder auf den Wassertropfen der Überträger-Grids auf befilmte Schlitzlochgrids übertragen. Hierzu diente eine Apparatur (Abb. 2a), die aus einem Mikroskop-Kreuztisch bestand, auf dem ein Trägertisch (Abb. 3) montiert werden konnte. Auf dem Trägertisch wurden mit doppelseitigem Klebeband befilmte Grids befestigt. Durch die Verstellmöglichkeiten von Kreuztisch und Trägertisch konnten die Grids in jede Position gefahren und um ihre eigene Achse gedreht werden. Beim Übertragungsvorgang wurden die Überträger-Grids an ihrem Handgriff in einer bestimmten Lage fixiert. Dann wurde ein befilmtes Grid mit Hilfe des Kreuztisches unter das Überträger-Grid gefahren, bis das befilmte Grid den Wassertropfen von unten berührte. Die Wasserschicht, die sich nun zwischen den beiden Grids befand, konnte vorsichtig mit einer feinen Filterpapierspitze (Abb. 3) abgesaugt werden. Gleichzeitig wurde das befilmte Grid mit der Höhenverstellung des Kreuztisches nachgeführt, bis sich nahezu kein Wasser mehr zwischen den Grids befand. Nachdem sich die Schnittbänder auf den Trägerfilm gesenkt hatten, wurde einige Minuten gewartet, bis auch das restliche Wasser zwischen beiden Grids verdunstet war, bevor beide Grids wieder getrennt wurden. Dieser Vorgang ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.

Nach dem Übertragungsvorgang wurden die Grids mit einer Pinzette vorsichtig vom doppelseitigen Klebeband des Trägertisches gelöst und die Schnitte dann kontrastiert.

Abb. 2. Serienschnitt-Technik. **a.** Gesamtansicht der Serienschnitt-Apparatur. Die Überträger-Grids (Ü) werden aus der feuchten Kammer (FK) entnommen und in einer Halterung (H) fixiert. Die befilmten Grids sind auf einem Trägertisch (T) montiert. Der Trägertisch sitzt auf einem Mikroskop-Kreuztisch (K). Durch eine Binokularlupe (B) und eine Beleuchtung mit flexiblem Lichtleiter (L) kann der Übertragungsvorgang kontrolliert werden. **b.** Feuchte Kammer. Die Wassertropfen im Schlitzloch der Überträger-Grids (Ü) halten sich in der mit Wasserdampf gesättigten Luft mehrere Stunden. **c.** Überträger-Grids. Zwei präparierte Überträger-Grids mit Handgriff (Mitte und rechts) und ein Original-Überträger-Grid (links unten), wie es von der Fa. Veco (Hilversum/Niederlande) als Sonderanfertigung in Edelstahl geliefert wurde. Ein handelsübliches Schlitzlochgrid (links oben) zeigt, daß das Überträger-Grid dasselbe Muster aufweist.



2a



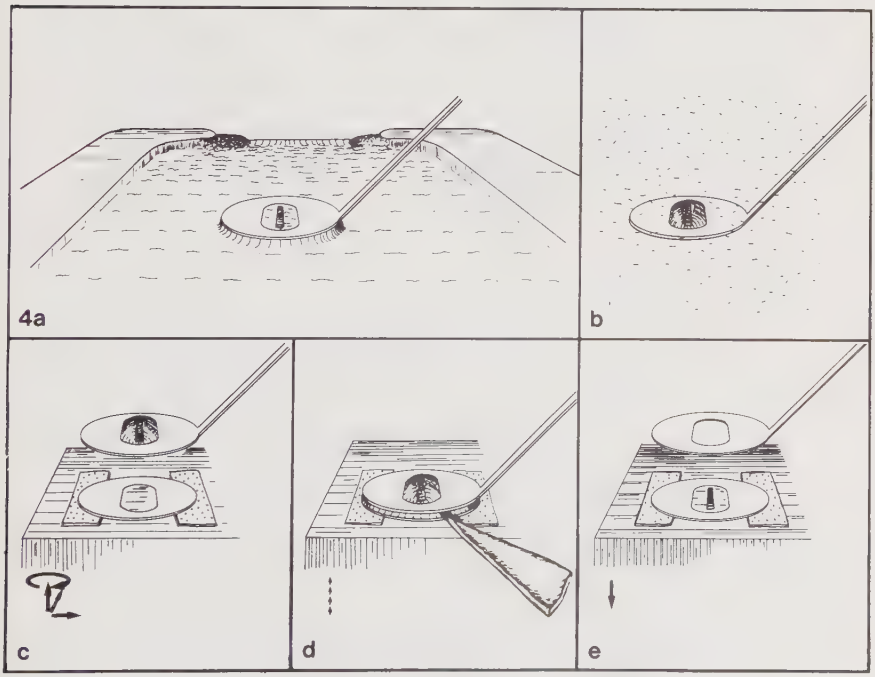
b

c

Abb. 3. Übertragungsvorgang bei der Serienschnitt-Technik. Das Überträger-Grid (Ü) ist mit seinem Handgriff in einer Halterung (H) fixiert. Befilmte Grids auf dem Trägertisch (T) sind mit Hilfe eines Mikroskop-Kreuztisches unter das Überträger-Grid gefahren und haben Kontakt mit dem Wassertropfen. Das Wasser zwischen den beiden Grids wird mit einer Filterpapierspitze (F) vorsichtig abgesaugt und das befilmte Grid gleichzeitig nachgeführt.

Abb. 4. Schematische Darstellung der Serienschnitt-Methode. **a.** Das Schnittband wird aus dem Wassertrog des Diamantmessers mit einem (unbefilmten) Überträger-Grid aufgenommen. **b.** Nach dem Aufnehmen schwimmt das Band auf einem Wassertropfen, der sich im Schlitzloch des Überträger-Grids befindet. Der Wassertropfen hält sich in mit Wasserdampf gesättigter Luft mehrere Stunden. **c.** Ein befilmtes Schlitzlochgrid, das mit doppelseitigem Klebeband auf einem Trägertisch befestigt ist, wird an das Überträger-Grid herangefahren, bis es Kontakt mit dem Wassertropfen hat. **d.** Die Wasserschicht zwischen den beiden Grids wird mit einer feinen Filterpapierspitze vorsichtig abgesaugt und das befilmte Grid gleichzeitig mit Hilfe des Kreuztisches nachgeführt. **e.** Haben sich die Schnitte auf den Trägerfilm gesenkt und ist das restliche Wasser zwischen den beiden Grids verdampft (wenige Minuten warten), werden beide Grids wieder getrennt.
Die Pfeile links unten in den Abb. c-e deuten die Verstellmöglichkeiten bzw. die Bewegungen des Trägertisches während des Übertragungsvorganges an.

H
U
F
T
3


4a
b
c
d
e

5.2.3. Berechnung der durchschnittlichen Schnittdicke.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Schnittdicke war wichtig, um die genaue räumliche Lage jeder einzelnen Schnittebene in Schnittrichtung festlegen und damit einen in ihren dreidimensionalen Verhältnissen verzerrungsfreie räumliche Rekonstruktion des Gewebeausschnitts ermöglichen zu können.

An den ersten und letzten Schnitten einer Schnittserie wurden im Mikroskop bei Übersichtsvergrößerung (z.B. 200-fach) die parallelen Längskanten vermessen; dabei wurde mit Hilfe der Meßskala an den Stelltrieben des Objekttisches die Koordinaten der Endpunkte der Schnitt-Längskanten bestimmt und vektoriell deren Länge berechnet. Auf diese Weise wurden die ersten bzw. letzten fünf Schnitte einer Serie vermessen, dann wurde das arithmetische Mittel aus den Kantenlängen der ersten bzw. letzten Schnitte gebildet (M_1 bzw. M_2). Es wurden jedoch nur Schnitte vermessen, die bei mikroskopischer Kontrolle keine Verzerrungen (z.B. Falten, Stauchungen durch Berührung mit dem Rand des Schlitzloches) aufwiesen.
Aus den beiden arithmetischen Mitteln der Kantenlängen, dem Vergrösserungsfaktor des Mikroskops, dem Neigungswinkel der Pyramidenseiten und der Gesamtzahl der Schnitte in der Serie wurde die durchschnittliche Schnittdicke nach folgender Gleichung berechnet:

$$d = \frac{\tan\alpha(M_2 - M_1)}{2nV}$$

wobei M_1 ... arithmetisches Mittel aus den Kantenlängen der ersten Schnitte

M_2 ... arithmetisches Mittel aus den Kantenlängen der letzten Schnitte

V ... Vergrößerung der Schnitte bei der Längenmessung

α ... Neigungswinkel der Pyramidenseiten

n ... Gesamtzahl der Schnitte in der Serie

d ... durchschnittliche Schnittdicke ist.

6. Befilmen von Grids.

Sehr dünne Trägerfilme, wie sie mit Pioloform- bzw. Formvar-Lösungen von 0,25-0,75% möglich sind, sind für den Elektronenstrahl sehr durchlässig und eine wichtige Voraussetzung für hohe Auflösung, z.B. bei negative staining virologischer Präparate oder von Molekülen. Diese Filme sind jedoch mechanisch wenig stabil und für die Befilmung von Schlitzlochgrids in Schnittserien ungeeignet. Erst Filme aus Lösungen höherer Konzentration liefern mechanisch stabile Filme, die, wenn sie dünn genug hergestellt werden, bei Ultradünnschnitten nicht auflösungsmindernd sind.

Erfahrungsgemäß eigneten sich Pioloform- und Formvar-Lösungen in einer Konzentration von 1,5% sehr gut für dünne Trägerfilme (fast durchsichtig bis silberne Interferenzfarbe auf der Wasseroberfläche) mit hoher mechanischer Stabilität. Qualitative Unterschiede in den Filmen waren zwischen Dioxan und Dichloräthan als Lösungsmittel nicht feststellbar, ebensowenig zwischen Formvar und Pioloform. Formvar-Trägerfilme verhielten sich jedoch im Elektronenstrahl etwas ungünstiger als Pioloform-Filme: sie wurden - trotz Kohlebedampfung - "weich", wodurch es zu stärkeren Verzerrungen im Schnitt und damit in der elektronenmikroskopischen Aufnahme kommen konnte. Wurde Dichloräthan als Lösungsmittel verwendet, ließen sich die Filme bei der Herstellung auffallend schlechter von Glasobjektträgern abschwemmen. So wurden für die Befilmung von Schlitzlochgrids in Schnittserien 1,5% Pioloform, in Dioxan gelöst, verwendet.

Glasobjektträger wurden folgendermaßen gereinigt:

- einstellen in Chromschwefelsäure für mindestens 15 min
- abspülen mit Aqua dest.
- mechanische Reinigung mit Kleenex-Tüchern
- abspülen mit Aqua dest.
- einstellen in 5%ige Ammoniaklösung für wenige Minuten (dieser Schritt ist nicht unbedingt notwendig und kann weggelassen werden, wenn die Objektträger nach der mechanischen Reinigung fettfrei sind)
- Trocknen der Glasoberfläche durch einmaliges Darüberwischen mit einem frischen Kleenex-Tuch (nicht reiben, da sich die Ober-

fläche sonst statisch auflädt und sich Fusseln bilden)
- optisch auf Reinheit kontrollieren.

Die gereinigten Objektträger wurden befilmt, die Trägerfilme von der Glasoberfläche abgeschwemmt, mit gereinigten Grids belegt. Dann wurde der Film von der Wasseroberfläche abgenommen, wie im Prinzip von Schaefer und Harker (1942), Revell und Agar (1955) und Reimer (1967) beschrieben. Die von uns modifizierte Methode ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

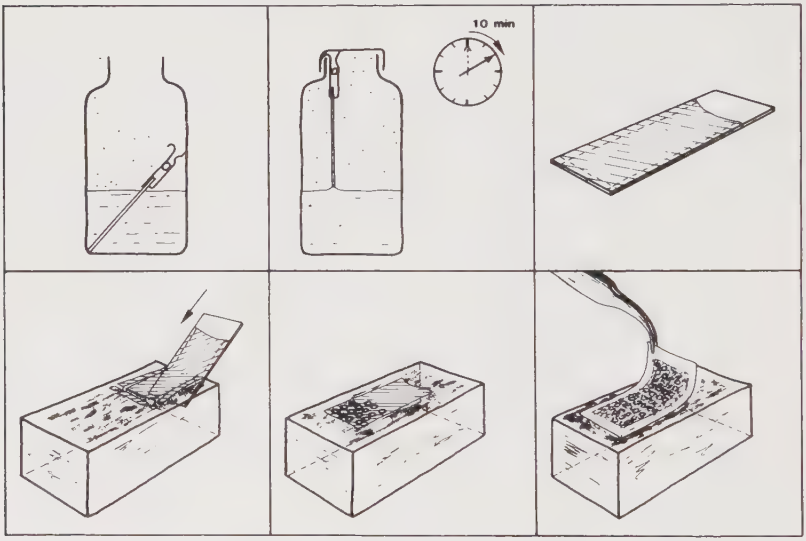


Abb. 5. Befilmen von Grids. **a.** Einstellen des Objektträgers in die Befilmungslösung für 5-10 Sekunden. **b.** Objektträger für ca. 10 Minuten an einer Klammer im Lösungsmitteldampf hängen lassen. Die untere Kante des Objektträgers berührt dabei gerade die Lösungsmitteloberfläche. Die Lösung auf dem Objektträger kann dadurch ablaufen und ein gleichmäßig dünner Film bleibt zurück. Nach 10 Minuten wird der Objektträger aus dem Lösungsmitteldampf entfernt. **c.** Nach dem Antrocknen des Films auf dem Objektträger wird der Film entlang der gestrichelt gezeichneten Linie mit einer Rasierklinge angeritzt und an den Objektträger-Kanten mit der Klinge vorsichtig entlanggefahren, so daß der Film auf einer Wasseroberfläche abgeschwemmt werden kann. **d.** Abflottieren des Trägerfilms auf einer sauberen Wasseroberfläche unter einem Winkel von 40-60°. Interferenzfarbe, Gleichmäßigkeit und Reinheit des Trägerfilms können mit reflektiertem Licht kontrolliert werden. **e.** Belegen des Trägerfilms mit Grids. **f.** Mit einem Stück Parafilm, der über Trägerfilm und Grids auf die Wasseroberfläche gelegt wird, können die befilmten Grids abgenommen werden.

Die Schlitzlochgrids wurden vor dem Befilmen mit Ameisensäure, Aceton und Aqua dest. mit Ultraschall gereinigt. Es hatte sich gezeigt, daß unsaubere Stellen auf dem Grid (z.B. Fett, Rückstände von der Gridherstellung) die Stellen waren, an denen sich beim Übertragen der Trägerfilm bevorzugt löste und dies eventuell zum Reißen des Trägerfilms führte.

Wurden Objektträger und Grids nach den oben beschriebenen Methoden sehr sorgfältig gereinigt und die Grids nach der Methode, wie sie in Abb. 5 dargestellt ist, befilmt, erhielt man mit hoher Zuverlässigkeit sehr saubere, bei Ultradünnschnitten nicht auflösungsbegrenzende und mechanisch sehr stabile Trägerfilme.

7. Schnittkontrastierung.

Die Kontrastierung von Hand, wie sie teilweise an Einzelschnitten verwendet wurde, erfolgte nach folgender Methode:

- Befeuchten der Grids in Aqua dest. (5 min);
- methanolische Uranylacetat-Lösung im Dunkeln (10 min);
- 2x in 70% Methanol waschen;
- 2x in Aqua dest. waschen;
- gut trocknen lassen;
- 45-60 sec in Bleicitrat-Lösung;
- 2x in 0,01 n NaOH waschen;
- 4x in Aqua dest. waschen und überschüssiges Wasser mit Filterpapier absaugen.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zusammensetzung und Herstellung der Kontrastierungslösungen ist in Abschnitt 1.2. beschrieben.

Bei dieser Methode traten manchmal Kontaminationen und Schwermetallniederschläge auf. In einigen Fällen rissen die Trägerfilme von Schlitzlochgrids durch starke mechanische Belastungen beim Kontrastierungsvorgang. Für Schnittserien wurde daher die Kontrastierung in einem LKB Ultrostainer durchgeführt (Uranylacetat-Lösung 30 min/40°C; Bleicitrat-Lösung 8 min/25°C). Kontaminationen und Reißen von Träger-

filmen durch mechanische Belastung waren dabei nahezu ausgeschlossen.

8. Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop.

Einzelschnitte wurden bei 80 KV mit einem Siemens Elmiskop 102 und einem Zeiss EM 109 oder bei 60 KV mit einem Philips 201c untersucht. Als Aufnahmematerial wurde Agfa Scientia (Planfilm 6x9) verwendet, der in Temal Hydrochinon (Fa. Tetenal) entwickelt wurde.

Voraussetzung für die Auswertung von Serienschnitten war, mit einem Goniometer arbeiten zu können, um auf allen Schnitten dieselbe Orientierung des fotografierten Ausschnitts beibehalten zu können. Damit konnte die allen Aufnahmen gemeinsame Fläche auf den aufeinanderfolgenden Schnitten erheblich vergrößert werden. Pro Schnittserie mußten für die spätere 3D-Rekonstruktion zwischen 250 und 550 Aufnahmen gemacht werden. Dafür war am Mikroskop eine Fotografiereinrichtung notwendig, die einen schnellen Wechsel des Aufnahmematerials erlaubte ohne lange Wartezeiten (z.B. lange Pumpzeiten für das Evakuieren der Fotokammer). Weiterhin war es erforderlich auf jedem Schnitt einen möglichst großen Gewebeausschnitt mit möglichst wenig Aufnahmen zu fotografieren. Das Auflösungsvermögen des Mikroskops - einschließlich Goniometer und Aufnahmesystem - mußte deshalb bei kleinen Vergrösserungen (2000- bis 3000-fach) eine eindeutige Identifikation der kleinsten, interessierenden Strukturen (Filopodiendurchmesser 100 nm) ermöglichen.

Diese Voraussetzungen und Möglichkeiten bot das Elektronenmikroskop EM 109 der Fa. Zeiss, dessen Goniometer bedingt durch sein Konstruktionsprinzip erschütterungsunempfindlich ist und eine hohe Auflösung gewährleistet. Die TFP-Außenkamera erlaubte einen großen Filmdurchsatz innerhalb kurzer Zeit, da nach Filmwechsel keine Pumpzeiten notwendig waren. Das Auflösungsvermögen des gesamten Systems lag bei 3000-facher Vergrößerung bei ca. 10 nm. Auflösungsbegrenzend war dabei die Faserplatte der TFP-Kamera, deren Einzelfasern eine maximale Auflösung von ca. 30 μm auf dem Aufnahmematerial bewirken. Die Filopodienstrukturen konnten damit bei 3000-facher Vergrößerung hinreichend gut aufgelöst

werden. Als Aufnahmematerial in der TFP-Kamera wurde ebenfalls Agfa Scientia verwendet, jedoch von 70 mm-Filmrollen selbst konfektioniert.

Vor der Untersuchung einer Schnittserie am Elektronenmikroskop wurden mit Hilfe einer Binokularlupe von jedem Grid einer Serie Zeichnungen der Schnitte und der Lage der Schnittbänder im Schlitzloch angefertigt. Eventuelle Kontaminationen und die Interferenzfarben der einzelnen Schnitte wurden ebenfalls notiert. Somit konnte bei der darauffolgenden Auswertung am Elektronenmikroskop jeder einzelne Schnitt verläßlich und schnell, ohne auf kleine Übersichtsvergrößerungen wechseln zu müssen, gefunden werden.

Bei der elektronenmikroskopischen Auswertung einer Schnittserie wurden einige Schnitte aus der Mitte der Serie herausgegriffen und im Elektronenmikroskop bei 10000- bis 20000-facher Vergrößerung auf interessante Strukturen wie Fasern, Wachstumskegel und orientierte extrazelluläre Räume untersucht. Diese Gewebeausschnitte wurden dann auf den vorhergehenden und nachfolgenden Schnitten verfolgt und fotografiert. Als Orientierung dienten dabei markante Gewebestrukturen und leichte Scharten des Diamantmessers, die auf den Schnitten Spuren hinterliessen. Diese Scharten hatten den Vorteil, daß sie auf den Schnitten an konstanter Stelle zu finden waren, wogegen Gewebestrukturen ihre Lage u.U. sehr stark verändern und somit der fotografierte Ausschnitt erheblich driften konnte.
Von durchschnittlich jedem zweiten Schnitt wurden je nach Größe des interessanten Gewebeausschnitts zwei bis vier überlappende Aufnahmen gemacht. Dabei wurde ein Gebiet erfaßt, das 45-80 μm breit und, ausgehend von der Basallamina, ca. 16-20 μm scleral in die Tiefe reichte.

9. Dreidimensionale Rekonstruktionen.

Die Negative der elektronenmikroskopischen Auswertung wurden im Kontaktverfahren auf Kodalith-Filmmaterial umkopiert, um die Einzelaufnahmen einer Schnittebene zu einem Aufnahmenband zusammensetzen zu können.

In einem ersten Schritt mußte die räumliche Lage der einzelnen EM-Aufnahmen zueinander festgelegt werden. In Schneiderichtung (z-Richtung) war die Lage der einzelnen Schnitte durch die Schnittnummer und die berechnete durchschnittliche Schnittdicke festgelegt. Die Lage der Aufnahmen in der jeweiligen Schnittebene (x- und y-Richtung) mußte jedoch durch Ausrichten und Aufeinanderpassen entsprechender Strukturen auf aufeinanderfolgenden Aufnahmen bestimmt werden. Dieses sogenannte "Alignment" der einzelnen EM-Aufnahmen ist in Abschnitt 9.1 beschrieben.

In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe der EM-Aufnahmen eine dreidimensionale Computergrafik aufgebaut: von allen Aufnahmenbändern wurden Zeichnungen der Zellumrisse angefertigt, über eine Videokamera digitalisiert und dann mit Computerhilfe in eine 3D-Grafik umgesetzt (Abschnitt 9.2).

9.1. Ausrichten der EM-Aufnahmen (Alignment).

Für das Ausrichten der Aufnahmen einer Schnittebene zu Aufnahmen vorhergehender und nachfolgender Schnittebenen (Ausrichten in x-y-Ebene), das Alignment, hatte sich folgende Methode als einfachste und gleichzeitig zuverlässigste herausgestellt.

1. Zusammensetzen des ersten Aufnahmenbandes. Die überlappenden Einzelaufnahmen eines Schnittes aus der Mitte der Schnittserie wurden zu einem Aufnahmenband zusammengesetzt.
2. Eintragen von x-y-Koordinaten auf dem ersten Aufnahmenband. Das erste, zusammengesetzte Aufnahmenband wurde auf ein Leuchtpult, das mit einem x-y-Kooordinatensystem versehen war, gelegt und in der Mitte des Koordinatensystems mit Klebestreifen befestigt. Damit war genügend Bewegungsspielraum für die folgenden Aufnahmenbänder gegeben, falls diese ihre Lage in x- oder y-Richtung stärker verändern sollten. War das erste Aufnahmenband im Koordinatensystem positioniert, wurde es mit Koordinaten versehen. Die Lage des ersten Aufnahmenbandes war prinzipiell willkürlich.
3. Alignment der folgenden Aufnahmenbänder. Über das erste Aufnahmenband wurden die Einzelaufnahmen der nächsten Schnittebene gelegt und entsprechende Strukturen zur Deckung gebracht. Dabei wurde da-

rauf geachtet, daß Strukturen auf den überlappenden Aufnahmen fließend ineinander übergingen. Dies war teilweise schwierig, da durch leichte Verzerrungen im Schnitt selten alle Strukturen auf allen Aufnahmen zur Deckung gebracht werden und das Alignment in einem gewissen Rahmen oft nur ein Kompromiß sein konnte.

War das optimale Alignment des nächsten Aufnahmenbandes gefunden, wurden die Einzelaufnahmen zusammengesetzt, in entsprechender Position über das erste Aufnahmenband gelegt und mit Klebestreifen ebenfalls auf dem Leuchtpult befestigt. Danach konnte das darunterliegende, erste Aufnahmenband entfernt und das neue Aufnahmenband, wie das erste, mit Koordinatenpunkten versehen werden.

Das Alignment der folgenden Aufnahmen erfolgte auf dieselbe Weise: Alignment der Einzelaufnahmen der folgenden Schnittebene untereinander und zum vorhergehenden Aufnahmenband; Zusammensetzen des Aufnahmenbandes; Befestigen des neuen Aufnahmenbandes in geeigneter Position über dem vorhergehenden; Entfernen des vorhergehenden Aufnahmenbandes; Eintragen der Koordinatenpunkte auf dem neuen Aufnahmenband; usw.

Mit dieser Methode wurde in einem (willkürlich gewählten) Koordinatensystem die räumliche Lage aller Aufnahmenbänder einer Schnittserie in x-y-Ebene festgelegt.

9.2. Computer-gestützte 3D-Grafik.

Interessante Bereiche auf den Aufnahmenbändern, in denen Nervenfasern zu finden waren, wurden herausgegriffen und in diesen Ausschnitten Zeichnungen der Zellumrisse angefertigt. Hierzu wurden die Aufnahmenbänder wieder im Koordinatensystem auf dem Leuchtpult positioniert und der ausgewählte Bereich auf Transparentpapier umrahmt. Die Größe des Rahmens wurde so festgelegt, daß eine Zeichnung später in zwei bis drei Teilbildern digitalisiert werden konnte. Für die spätere Orientierung der Zeichnungen in der x-y-Ebene wurden in zwei diagonal gegenüberliegenden Ecken eines jeden Teilbilds Koordinatenpunkte eingezeichnet (Abb. 6). Alle innerhalb dieses Rahmens liegenden Zellumrisse

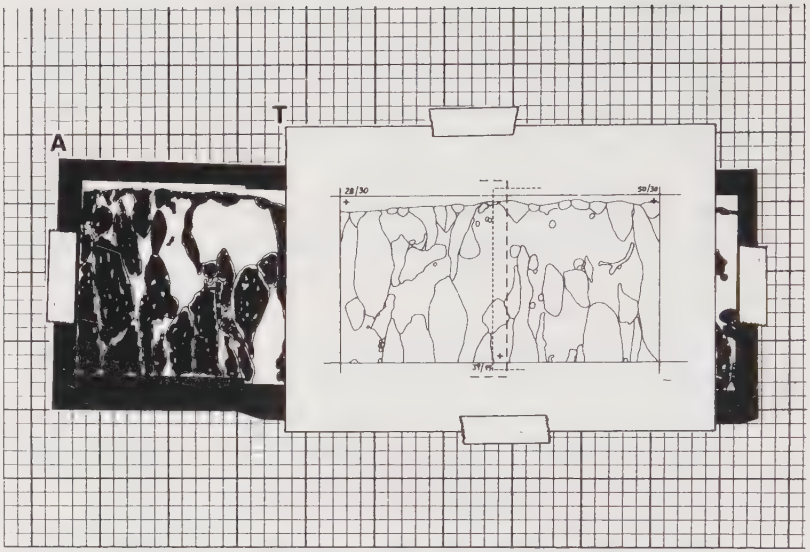


Abb. 6. Eintragen von Koordinatenpunkten auf Tuschezeichnungen. Ein Aufnahmenband A wird in seiner richtigen Position im Koordinatensystem des Leuchtpults befestigt. Über das Aufnahmenband wird Transparentpapier T gelegt und der ausgewählte Rahmen eingezeichnet. Innerhalb des Rahmens werden vom Aufnahmenband alle Zellumrisse durchgezeichnet. Die Größe des Rahmens wird so gewählt, daß die Tuschezeichnung in zwei bzw. drei überlappenden Aufnahmen mit der Videokamera digitalisiert werden kann (angedeutet durch die gestrichelte bzw. strichpunktierte Linie auf der Tuschezeichnung). In zwei diagonal gegenüberliegenden Ecken eines Teilbilds werden Koordinatenpunkte eingezeichnet und deren Werte außerhalb des Rahmens vermerkt. Somit kann später die Lage eines digitalisierten Teilbilds in der x-y-Ebene genau bestimmt werden.

wurden mit feinen Tuschezeichnern (Durchmesser 0,13 und 0,18 mm) auf das Transparentpapier übertragen.

Die bei der Erstellung der Computergrafiken eingesetzte Hardware bestand aus einem Minicomputersystem (Concept 32/97; Fa. Gould, Fort Lauderdale/USA), an das eine hochauflösende Videokamera (System C-1000; Fa. Hamamatsu) angeschlossen wurde. Die Software, die für die Digitalisierung der Zeichnungen und die folgenden bildverarbeitenden Schritte notwendig war, wurde von Hans-Werner Paulsen (MPI für Astrophysik, München-Garching) in der Programmiersprache Fortran 77 konzipiert und geschrieben.

Die Zeichnungen wurden zuerst über die Videokamera in Teilbildern digitalisiert (Abb. 7) und im Computer mit Hilfe des Grafikprogramms "grab" gespeichert. Jedes digitalisierte Teilbild bestand aus 512^2 Bildpunkten, wobei jeder Bildpunkt einen Grauwert zwischen 0 und 255 annehmen konnte. Die ungleichmäßige Ausleuchtung durch die Beleuchtungseinheit wurde ausgeglichen, indem das Teilbild während des Digitalisierens jeweils mit einem zuvor aufgenommenen Hintergrundbild der Beleuchtungsfläche verrechnet und erst das damit korrigierte Teilbild abgespeichert wurde (Shading-Korrektur). Die maximale Größe eines digitalisierten Teilbilds betrug 60 x 60 mm^2, die Punktauflösung somit 0,12 mm. Da eine Filopodienstruktur auf dem EM-Bild einen Durchmesser von mindestens 0,3 mm erreichte, konnte auch im digitalisierten Bild diese Struktur identifiziert werden.

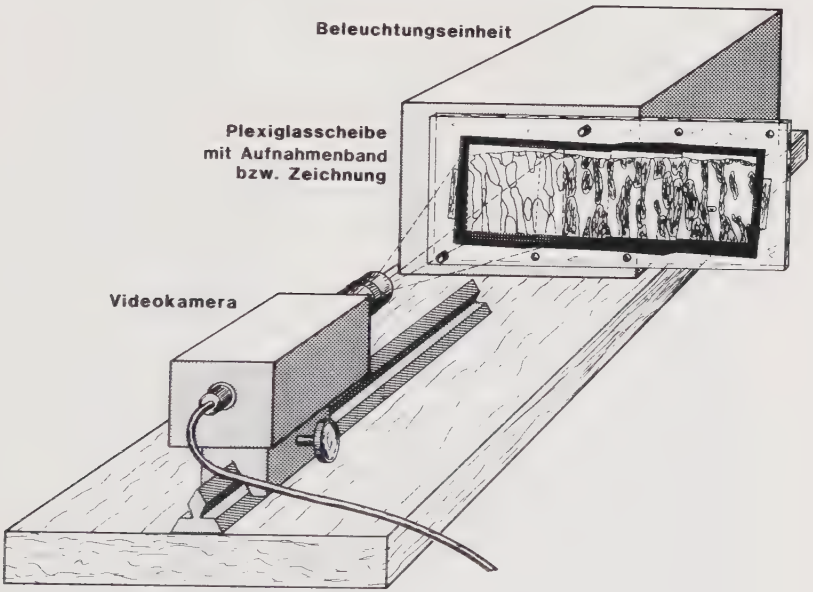


Abb. 7. Digitalisieren der Aufnahmenbänder und Zeichnungen. Auf der Frontplatte der Beleuchtungseinheit befinden sich zwei Stifte, an den eine Plexiglasscheibe befestigt wird. Die Scheibe kann mittels Bohrungen um jeweils einen bestimmten Betrag versetzt werden, so daß eine Tuschezeichnung oder ein Aufnahmenband in mehreren überlappenden Teilbildern mit Hilfe einer Videokamera digitalisiert werden kann. Der Aufnahmeabstand der Videokamera kann verändert und somit - je nach Abstand der Bohrungen auf der Plexiglasscheibe - die Größe eines digitalisierten Teilbilds variiert werden.

Mit dem Digitalisieren eines Teilbilds wurde die Schnittebene eingegeben, wodurch die Lage des Bilds in z-Richtung festgelegt wurde. Für die Bestimmung der Lage eines Bilds in der x-y-Ebene mußten Position und Werte der auf dem digitalisierten Bild sichtbaren Koordinatenpunkte in den Rechner eingelesen werden. Dabei wurden in einem "process"-Programm mit einem Cursor die Lage der Koordinatenpunkte und deren x- und y-Werte eingegeben. Somit war die räumliche Lage jedes Teilbilds eindeutig bestimmt.

Die folgenden bildverarbeitenden Operationen für den Aufbau einer 3D-Grafik wurden mit den Programmen "fill" und "3D" durchgeführt. Das "fill"-Programm diente dazu, die einzelnen Teilbilder so aufzubereiten, daß die verschiedenen Strukturen wie Nervenzellen, Gliazellen, extrazellulärer Raum und Vitrea markiert und somit unterscheidbar waren. "3D" errechnete die eigentliche 3D-Grafik.

Der erste Schritt im "fill"-Programm bewirkte, daß jeder Bildpunkt, der vorher einen bestimmten Grauwert hatte, entweder als schwarzer (Grauwert 0) oder als nichtschwarzer Punkt (Grauwert 255) dargestellt wurde, abhängig davon wie das Limit gewählt wurde. Alle Grauwerte unterhalb des Limits erhielten den Wert 0 (= schwarz), alle Grauwerte oberhalb den Wert 255 (= nichtschwarz). So nahm z.B ein Bildpunkt mit dem Grauwert 170 bei einem Limit von 180 den Grauwert 0, bei einem Limit von 160 den Wert 255 an. Bei geeigneter Wahl des Limits wurden alle Zellumrisse der Tuschezeichnungen im digitalisierten Bild als möglichst dünne, jedoch geschlossene, schwarze Linien auf einem homogenen Untergrund dargestellt. Mit einem weiteren "fill"-Unterprogramm konnte die Strichstärke der Linien im digitalisierten Bild auf 1 Pixel Breite reduziert werden: es wurden dabei von einer mehrere Pixel breiten schwarzen Linie gleichmäßig von beiden Seiten so lange schwarze Linienpunkte in nichtschwarze verwandelt, bis eine zusammenhängende, ein Pixel breite Linie entstanden war. Geschlossene Linien blieben jedoch als geschlossene Linien erhalten, nicht geschlossene Linien (z.B. die Koordinatenkreuze) verschwanden durch diese bildverarbeitende Operation.

Für die folgenden Programmschritte war es notwendig, daß die Zellumrisse als geschlossene Linien dargestellt waren, um bestimmte Flächen identifizieren und damit Zellen markieren und von anderen unterschei-

den zu können. In diesen sogenannten Identifikationsbildern wurden alle Bildpunkte innerhalb einer bestimmten, geschlossenen Linie mit einem Index gekennzeichnet und zur visuellen Kontrolle mit einer Farbe versehen. Neuronale Strukturen, bestimmte Gliazellen, Vitrea und Extrazellularraum wurden somit unterscheidbar.

Im Grafikprogramm "3D" wurde aus den einzelnen Teilbildern eine dreidimensionale Darstellung aufgebaut. Dazu dienten die Bilddaten, die in den vorhergehenden bildverarbeitenden Operationen eingegeben und abgespeichert worden waren, als Grundlage. Die einzelnen Teilbilder konnten damit räumlich richtig angeordnet und ausgewählte Strukturen isoliert dargestellt werden. Um auf den 3D-Bildern die notwendigen Informationen zu gewinnen, war das "3D"-Programm so strukturiert worden, daß bestimmte Parameter variiert werden konnten:

- Index: Darstellung der Strukturen mit den ausgewählten Indices, wobei z.B. Nervenzellen, aus ihrer Umgebung isoliert, gezeigt werden konnten.

- Window: Durch Eingabe von Minimal- und Maximalwerten für die x- und y-Koordinaten konnte ein bestimmter Bildausschnitt gewählt und die Größe des rekonstruierten Gewebeblocks damit bestimmt werden.

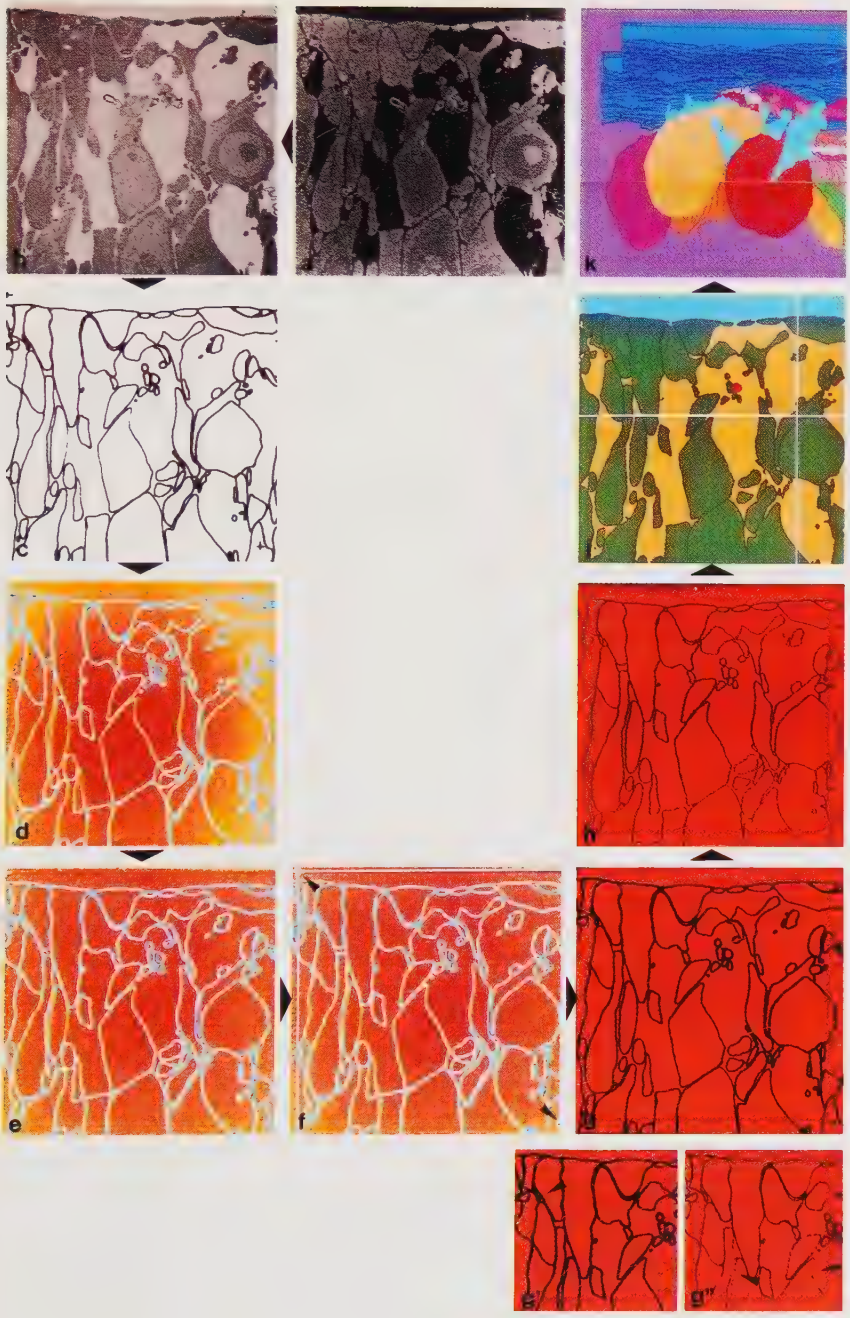
- Distance: Der Abstand der einzelnen Schnittebenen konnte entsprechend der errechneten durchschnittlichen Schnittdicke eingegeben werden.

- Rotation: Durch Drehung der Schnittebenen um die z-Achse und anschließende Kippung um die x-Achse konnte der Betrachtungswinkel verändert und damit günstige Perspektiven erreicht werden (sh. auch Hinweis im Abildungsverzeichnis). Die Berechnung von Stereobildern war damit möglich.

Die einzelnen bildverarbeitenden Schritte, vom EM-Negativ bis zur 3D-Computergrafik sind in Abb. 8 nochmals zusammengefaßt. Schließlich konnten mit dem "display"-Programm die gerechneten Bilder abgerufen, auf dem Monitor dargestellt und fotografiert werden. Die Farben für die einzelnen Strukturen, d.h. für die einzelnen Indices, konnten dabei frei gewählt werden, so daß z.B. die einzelnen Neurone voneinander

gut unterscheidbar waren und sich von Hintergrund und Vitrea abhoben.

Abb. 8. Vom EM-Negativ zur 3D-Computergrafik. **a.** EM-Negativ. **b.** Kodalith-Positiv. Die einzelnen EM-Negative werden im Kontaktverfahren umkopiert, so daß mit den Positiven, ohne Verlust der Original-Negative, die Aufnahmenbänder zusammengesetzt werden können. **c.** Tuschezeichnung. Von einem ausgewählten Ausschnitt eines Aufnahmenbandes wird eine Tuschezeichnung der Zellumrisse angefertigt. In den Ecken werden Koordinatenpunkte eingetragen (links oben und rechts unten). **d.** Digitalisieren der Zeichnung. Die Zeichnung wird über eine Videokamera digitalisiert und zusammen mit den Bildddaten (Schnittseriennummer, Schnittnummer) mit Hilfe des Programms "grab" im Computer gespeichert. Die Grauwertverteilung im digitalisierten Bild wurde verdeutlicht, indem bestimmten Grauwertbereichen Farben zugeordnet wurden. **e.** Korrigiertes, digitalisiertes Bild der Zeichnung. Im digitalisierten Bild werden Hintergrundfehler (z.B. ungleichmäßige Ausleuchtung, Hardwarefehler der Videokamera) korrigiert, indem das digitalisierte Bild der Zeichnung mit mit dem digitalisierten Bild der Beleuchtungsfläche verrechnet wird. Wie in Abb. e ist die Grauwertverteilung durch Farbumsetzung verdeutlicht. **f.** Einlesen der Koordinaten. Die auf dem digitalisierten Bild sichtbaren Koordinatenpunkte (schwarze Pfeile) werden mit Hilfe des "process"-Programms und eines Cursors (weiße Linien links und oben) als Bilddaten eingegeben. **g.** Wahl des geeigneten Limits. Abhängig vom Grauwert des jeweiligen Bildpunkts und vom gewählten Grauwert-Limit bekommt der Bildpunkt den Grauwert 0 oder 255. In diesem ersten Schritt des "fill"-Programms entsteht eine Zeichnung mit schwarzen Linien auf einem homogenen Hintergrund. **g'.** Limit zu hoch: feine Strukturen "wachsen zu" (schwarzer Pfeil) und können in den folgenden bildverarbeitenden Schritten nicht mehr als Zellumrisse erkannt werden. **g".** Limit zu tief: manche Linienpunkte werden zu Grauwert 255 = Hintergrund. Ursprünglich geschlossene Linien bekommen Lücken (schwarze Pfeile) und können in den folgenden bildverarbeitenden Schritten ebenfalls nicht mehr als Zellumrisse erkannt werden. **h.** Minimieren der Linienstärke auf ein Pixel Breite. In einem weiteren "fill"-Unterprogramm werden die Linien der Zellumrisse auf ein Pixel Breite reduziert. Geschlossene Linien bleiben dabei geschlossen, nicht geschlossene Linien (z.B. Koordinatenkreuze) werden eliminiert. **j.** Identifikation von Strukturen. Das "fill"-Unterprogramm ermöglicht, bestimmte Strukturen zu markieren und voneinander zu unterscheiden. Zur optischen Kontrolle werden die mit Hilfe des Cursors (weißes Koordinatenkreuz) markierten Flächen eingefärbt. **k.** 3D-Computergrafik. Alle mit dem "fill"-Programm bearbeitenten Teilbilder können zusammen mit den Bilddaten (Koordinaten der Teilbilder, Schnittnummern usw.) und weiteren Informationen (z.B. Schnittdicke, Wahl des Ausschnitts) zum Aufbau einer 3D-Grafik herangezogen werden.


b
a
k
c
d
h
e
f
g
e'
g''

III. ERGEBNISSE

1. Gefrierfixierung und Gefriersubstitution.

1.1. Test verschiedener Gefrierschutzmittel.

Embryonales Nervengewebe, das ohne Gefrierschutzmittel gefrierfixiert wird, zeigt starke Zerstörung der Ultrastruktur durch Kristallisation des Zellwassers (Abb. 9). Lediglich in einem Bereich von maximal 5 µm unter der Basallamina sind die Strukturen gut, teilweise sogar ausgezeichnet erhalten. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn Retinae so präpariert wurden, daß während der Gefrierfixierung das Kühlmittel unmittelbar an der Basallamina einwirken konnte.

Bei allen untersuchten Gefrierschutzmitteln ist eine Konzentration von mindestens 25-30% für eine ausreichende Gefrierschutzwirkung notwendig. Eine 30%ige Konzentration reicht jedoch bei den hochmolekularen Substanzen PVP und Dextran nicht aus, um bei der Gefrierfixierung genügend kleine Eiskristalle zu erhalten; die Ultrastrukturen werden zerstört (Abb. 10a). Für niedermolekulare Agentien ist diese Konzentration jedoch ausreichend, wie dies am Beispiel von DMSO gezeigt wird (Abb. 10b-d). Die Bildung von Kristallisationsartefakten nimmt mit steigender Gefrierschutzmittelkonzentration in auffallender Weise ab.

In weiteren Versuchen wurden Retinae unterschiedlich lang in Gefrierschutzmitteln inkubiert. Dabei wurden nur Substanzen, die bei einer Inkubationsdauer von 3 Std. und einer 25-30%igen Konzentration im Fixierpuffer für einen ausreichenden Gefrierschutz sorgten (Glycerin, Äthylenglycol, DMSO, DMF), weiter untersucht. Die langsam penetrierenden Substanzen Glycerin und Äthylenglycol (in Abb. 11 für Glycerin dargestellt) verursachen bei kurzzeitiger Inkubation von 30-60 min starke Zellschrumpfung im Gewebe (Abb. 11b,c). Bei dreistündiger Inkubation zeigen die Zellen noch eine leichte Schrumpfung: die interzellulären Spalten sind vergrößert (Abb. 11a). Äthylenglycol hat eine ähnliche Wirkung wie Glycerin. Beide Gefrierschutzmittel sind somit

für ultrastrukturelle und morphometrische Untersuchungen ungeeignet.

Die schnell penetrierenden Substanzen DMSO und DMF bieten auch bei Inkubationszeiten von 60 und 30 min einen guten Gefrierschutz (Abb. 12). Veränderungen in den Gewebestrukturen sind nicht zu erkennen. Vesikuläre Strukturen, Extraktion von Zellmaterial und andere ultrastrukturelle Artefakte, die stellenweise zu sehen sind, hängen wahrscheinlich mit Qualität und Art der Vorfixierung zusammen. DMSO und DMF sind somit als Gefrierschutzmittel geeignet, da sie das Gewebe während der Gefrierfixierung vor Kristallisationsartefakten schützen und gleichzeitig die Ultrastruktur des Gewebes nicht beeinflussen.

1.2. Test verschiedener Bedingungen für Vorfixierung und Inkubation in Gefrierschutzmittel.

Werden Embryonen nach der Perfusionsfixierung in 30% DMSO inkubiert (Fixierpuffer IX oder XII, Tab. I), ist die Gewebestruktur gut erhalten. Es sind keine Veränderungen in der Zellgröße und der Ultrastruktur der Zellen festzustellen (Abb. 13a). Die Perfusion mit Puffern, die bereits DMSO enthalten, führt jedoch zu einer extremen Schrumpfung der Gewebszellen (Abb. 13b).

Nach der Perfusionsfixierung mit Puffern, die als Fixativ 2,5% GA enthalten (Fixierpuffer VIII), und anschließender Inkubation in DMF (Fixierpuffer X), bleibt die Gewebeultrastruktur sehr gut erhalten (Abb. 14a-c). Das gilt auch, wenn mit einem Puffer perfundiert wird, der bereits DMF enthält (Fixierpuffer X). Membranen, Kernhüllen und Endoplasmatisches Reticulum können durch beide Methoden ausgezeichnet erhalten werden (Abb. 14b,e), die Mitochondrienstruktur ist jedoch häufig angegriffen, wenn nur GA als Fixativ verwendet wird (Abb. 14c,f).

Wird eine Aldehyd-Mischung aus 0,5% GA und 2% FA bei der Vorfixierung verwendet, so ist die Gewebestruktur ausgezeichnet erhalten, unabhängig davon, ob das Gewebe erst nach der Vorfixierung in DMF inkubiert wurde (Fixierpuffer XI, danach XIII) oder ob bereits mit DMF-haltigem Puffer perfundiert wurde (Abb. 15a,d). Strukturen wie Endoplasmati-

sches Reticulum, Kernhüllen und Zellmembranen sind ebenso gut erhalten (Abb. 15b,e) wie die Mitochondrien (Abb. 15c,f), die eine dichte Matrix zeigen.

Die Inkubation von Proben in 30% DMF führt zu ausgezeichneter Erhaltung der Zellstruktur. Es spielt dabei keine Rolle, ob zuerst vorfixiert und dann in Gefrierschutzmittel inkubiert wird oder ob das Gewebe gleichzeitig vorfixiert und mit DMF behandelt wird. Als Fixativ scheint jedoch eine Mischung aus GA und FA die Strukturerhaltung der Mitochondrien zu verbessern.
Mit GA(/FA)-Vorfixierung und einer nachfolgenden DMSO-Inkubation bleibt die Gewebestruktur ebenfalls gut erhalten.

Abb. 9. Gefrierfixierung ohne Gefrierschutz. Wachtel-Retina E3, quer; Basallamina am linken Bildrand. Perfusionsfixierung (Fix I, Tab. I); Gefrierfixierung; Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. Da bei der Gefrierfixierung das N_2-gekühlte Propan von der vitrealen Seite (links im Bild) einwirken konnte, sind die Strukturen unter der Basallamina gut, teilweise ausgezeichnet erhalten (Abb. b). Diese Zone reicht jedoch nur bis maximal 5 μm in scleraler Richtung. In tieferen Schichten sind die Gewebestrukturen durch Kristallisationsartefakte stark zerstört.

9a
15 cm
b)
1 µm

Abb. 10. Bestimmung der optimalen Gefrierschutzmittelkonzentration. Wachtel-Retina E3, quer; Basallamina jeweils am oberen Bildrand. Einwirkung des Kühlmittels in der Gefrierfixierung hier wie in allen folgenden Abbildungen von scleraler Seite (im Bild unten). **a.** Perfusionsfixierung (Fix I, Tab. I); Gefrierfixierung nach 3-stündiger Inkubation in Fixierpuffer mit 25% PVP (Fix II); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **b.** 5% DMSO in Fix I. **c.** 15% DMSO in Fix I. **d.** 25% DMSO in Fix I.

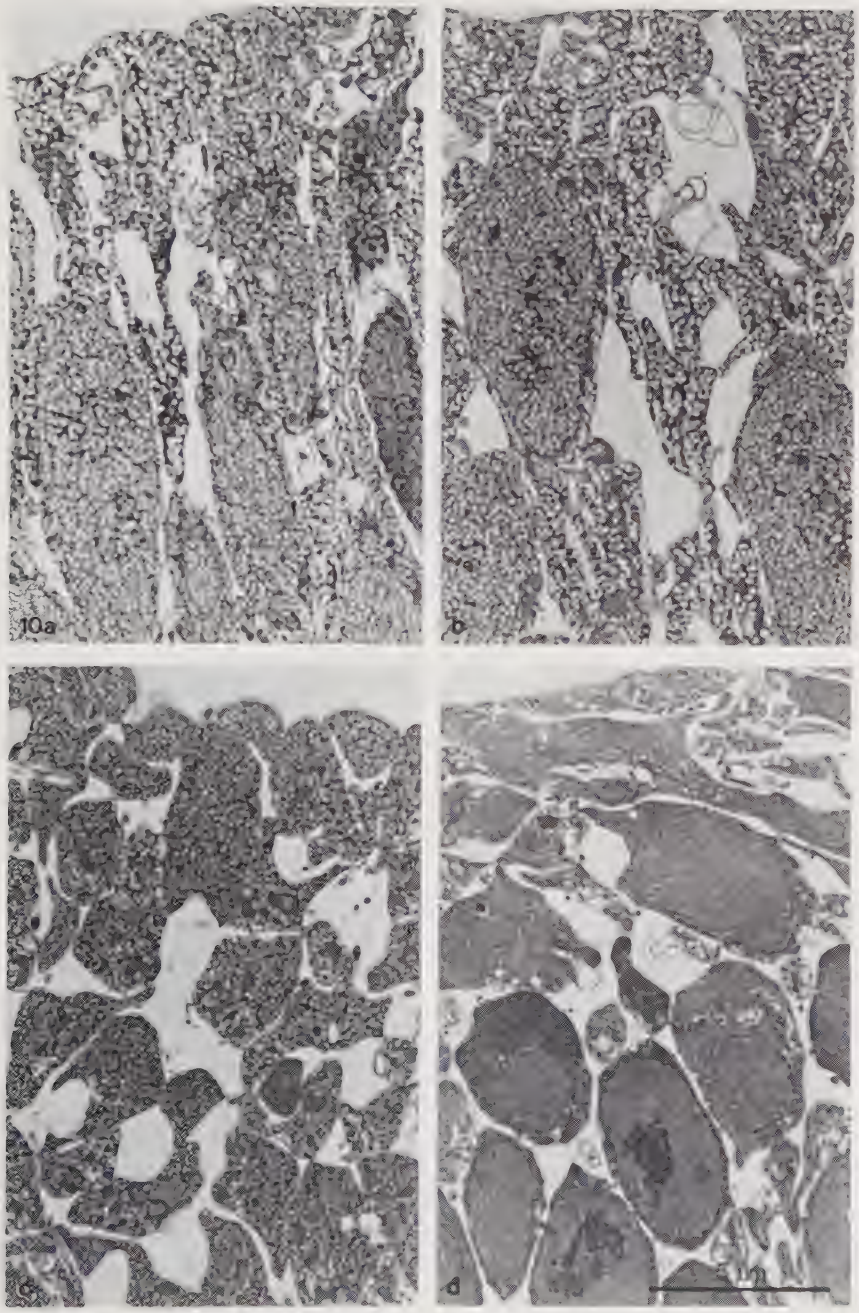

10a
b
c
d

Abb. 11. Glycerin als Gefrierschutzmittel. Wachtel-Retina E3 (Abb. a) und E3,5 (Abb. b und c), quer; Basallamina am linken Bildrand. **a.** Perfusionsfixierung (Fix I, Tab. I); Gefrierfixierung nach 3-stündiger Inkubation in Fixierpuffer mit 30% Glycerin (Fix IV); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **b.** 60-minütige Inkubation. **c.** 30-minütige Inkubation.

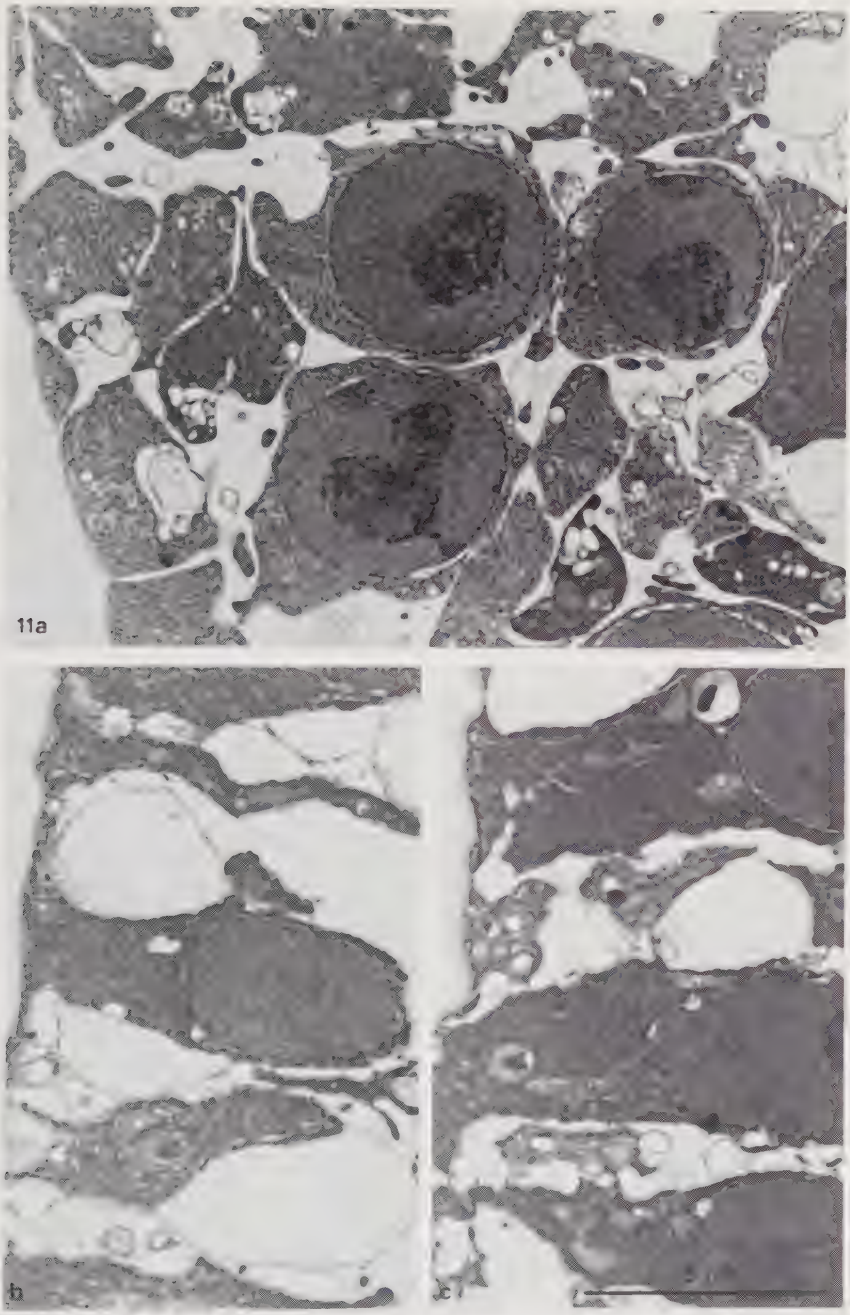
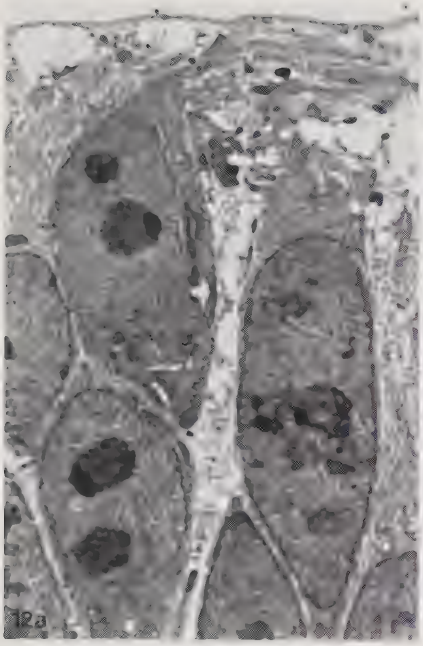
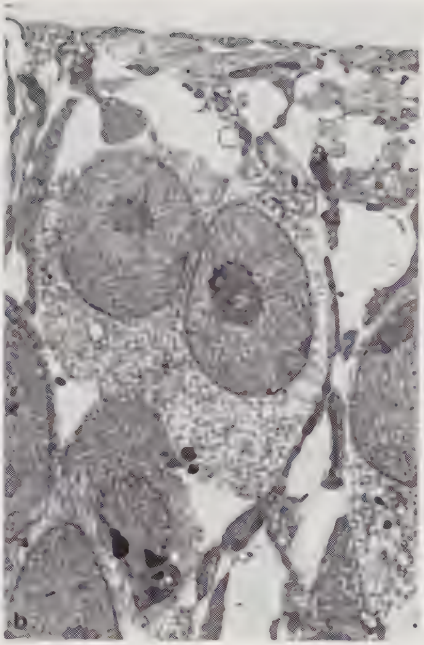
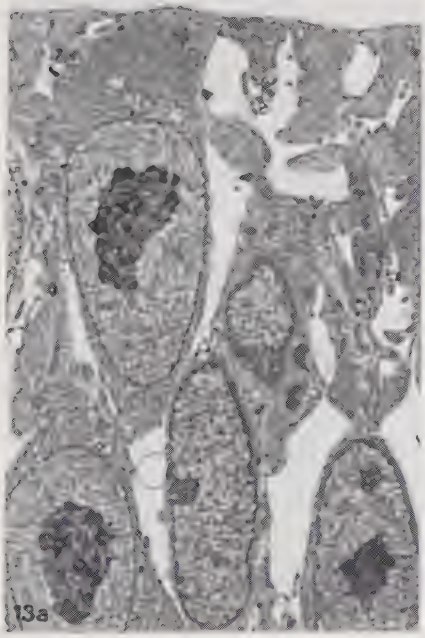

11a
b
c

Abb. 12. DMSO und DMF als Gefrierschutzmittel. Wachtel-Retina E4,5; quer; Basallamina am oberen Bildrand. **a.** Perfusionsfixierung (Fix I, Tab. I); Gefrierfixierung nach 30-minütiger Inkubation in Fixierpuffer mit 30% DMSO (Fix VI); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **b.** 30% DMF (Fix VII); 60 min.

Abb. 13. Inkubation in DMSO nach und während der Perfusionsfixierung. Wachtel-Retina E3, quer; Basallamina am oberen Bildrand. **a.** Perfusionsfixierung mit 2,5% GA (Fix VIII, Tab. I); Gefrierfixierung nach Inkubation in 30% DMSO/30 min (Fix IX); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **b.** Perfusionsfixierung mit 2,5% GA/30% DMSO (Fix IX); 30 min.


12a


b


13a

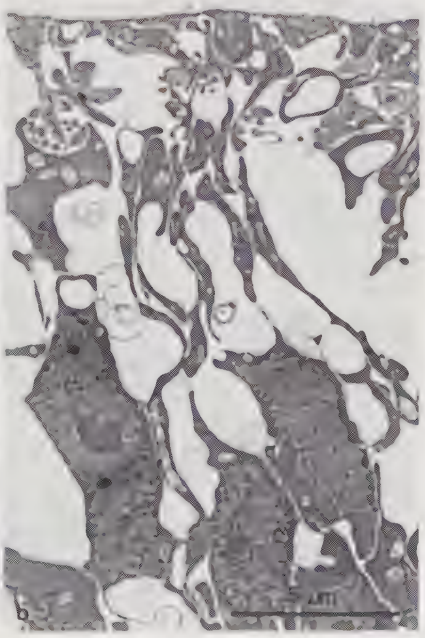

b

Abb. 14. Inkubation in DMF nach und während der Perfusionsfixierung mit GA. Wachtel-Retina E3, quer; Basallamina am oberen Bildrand (Abb. a,d). **a,b,c.** Perfusionsfixierung mit 2,5% GA (Fix VIII, Tab. I); Gefrierfixierung nach Inkubation in 30% DMF/30 min (Fix X); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **d,e,f.** Perfusionsfixierung mit 2,5% GA/30% DMF (Fix X); 30 min. Die Abbildungen zeigen die Gewebestruktur (a,d) und ultrastrukturelle Details wie Mitochondrien (c,f), Endoplasmatisches Reticulum (b,e), Zellmembranen (e) und Kernhülle (c,e).

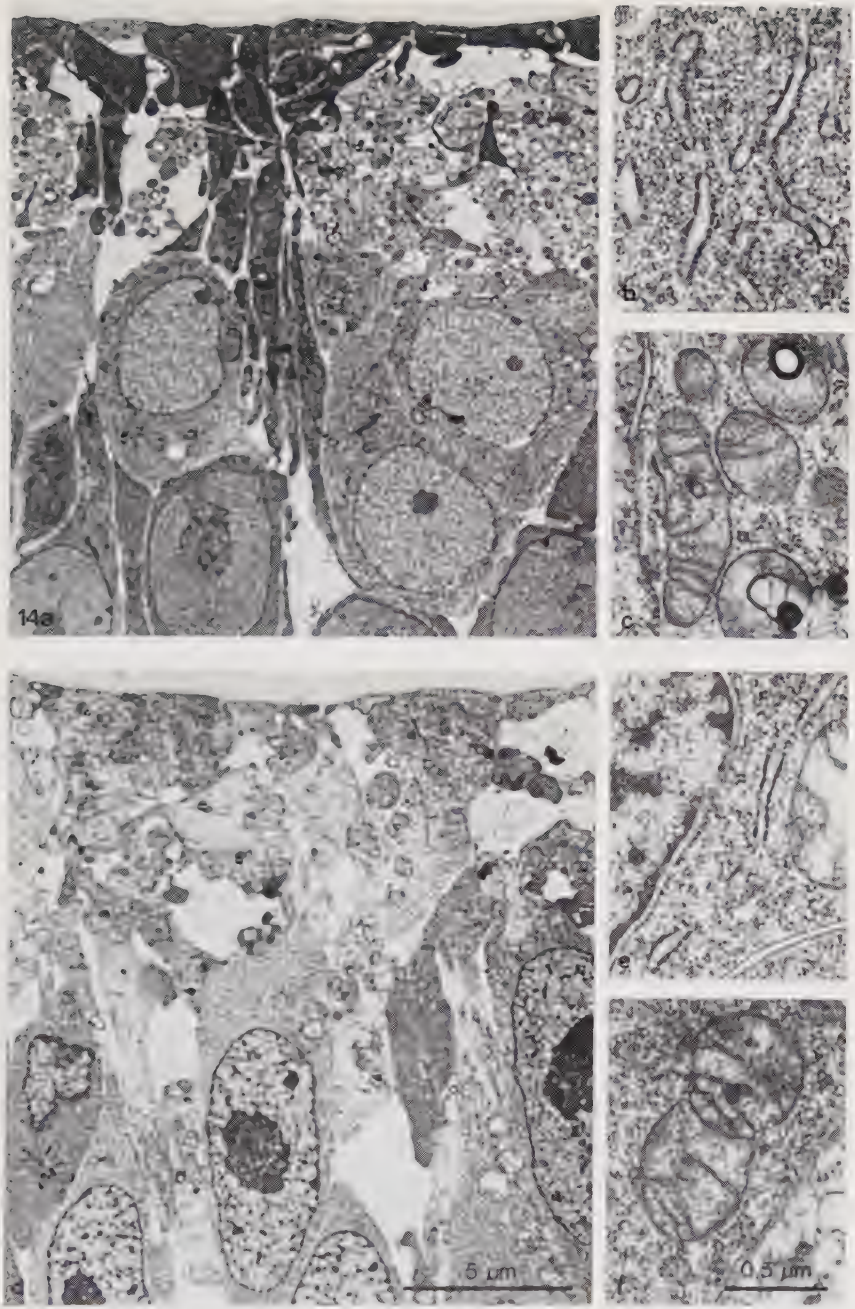
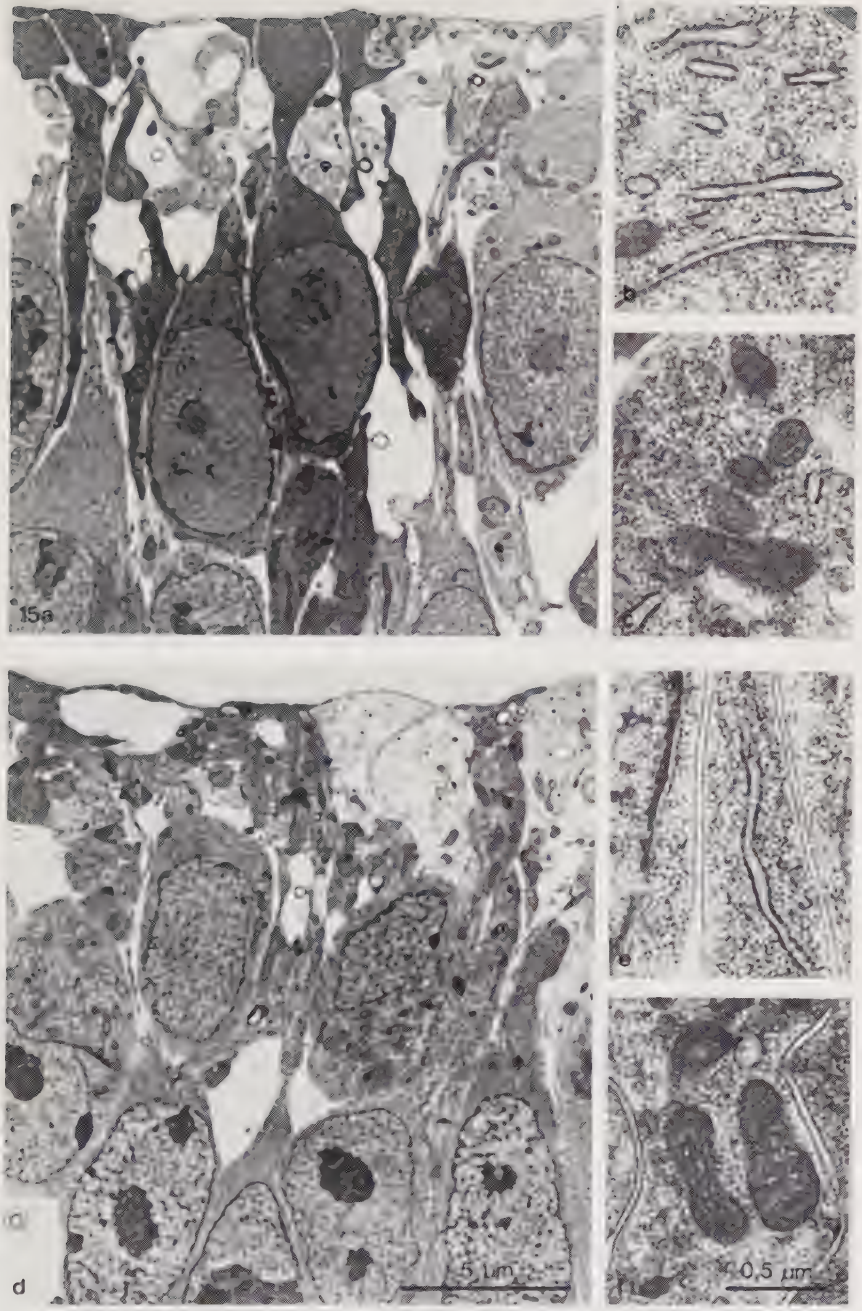

14a
b
c
d
e
f
5 µm
0,5 µm

Abb. 15. Inkubation in DMF nach und während der Perfusionsfixierung mit FA/GA. Wachtel-Retina E3, quer; Basallamina am oberen Bildrand (Abb. a,d). **a,b,c.** Perfusionsfixierung mit 2% FA/0,5% GA (Fix XI, Tab. I); Gefrierfixierung nach Inkubation in 30% DMF/30 min (Fix XIII); Gefriersubstitution; Epon-Einbettung. **d,e,f.** Perfusionsfixierung mit 2% FA/0,5% GA/30% DMF (Fix XIII); 30 min. Die Abbildungen zeigen die Gewebestruktur (a,d) und ultrastrukturelle Details wie Mitochondrien (c,f), Endoplasmatisches Reticulum (b,e), Zellmembranen (b,e,f) und Kernhüllen (b,e).


15a
b
c
d
5 µm
0,5 µm

2. Dreidimensionale Rekonstruktionen.

Alle dreidimensionalen Rekonstruktionen stammen aus dem zentralen Bereich der frühembryonalen Wachtel-Retina, ca. 50-100 µm in direkter Verlängerung der optischen Fissur. In diesem Gebiet sind die ersten Ganglienzellfasern zu erwarten (Halfter et al., 1985).

Die 60 Stunden alten Retinae wurden nach Methode 2 (gleichzeitige Inkubation in Fixierungs- und Gefrierschutzmittel; sh. Material und Methoden, Abschnitt 4) präpariert, die 68 Stunden alten Retinae nach Methode 1 (Inkubation in Gefrierschutzmittel nach Vorfixierung). Einzelaufnahmen von 77-78 Stunden alten Retinae stammen von Embryonen, die ebenfalls nach Methode 2 präpariert wurden.

2.1. Rekonstruktionen an 60 Stunden alten Embryonen.

Die Rekonstruktionen - im folgenden als SER1 bezeichnet - basieren auf zwei aufeinanderfolgenden Schnittserien aus 240 bzw. 280 Schnitten. Die durchschnittliche Schnittdicke beträgt 110 nm. Die rekonstruierte Region ist in nasotemporaler Richtung ca. 40 µm breit und reicht von der vitrealen Basallamina ungefähr 17-19 µm in sclerale Richtung. Durch die Anzahl der Schnitte und die Schnittdicke ergibt sich dorsoventral eine Länge von ca. 45 µm für den rekonstruierten Gewebeblock.

Es wurden vier Nervenzellen (N1-N4; Abb. 16, 17) mit Axonen anhand morphologischer Kriterien identifiziert. Die Zellkörper der Nervenzellen befinden sich außerhalb der rekonstruierten Region. Der vitreale Teil des Zellkörpers von Neuron N4 ist gerade noch zu sehen. N4 bildet ein Axon, das genau auf die optische Fissur zuwächst. Ein Teil des Wachstumskegels ist in der 3D-Grafik noch zu sehen. Dieser ist, wie auch der Wachstumskegel der Nervenfaser N3, relativ klein: growth cones retinaler Nervenfasern haben - mit Filopodien und Microspikes - eine Ausdehnung von 5, maximal 10 µm. Weitere Meßungen an Wachstumskegeln, die nicht in einer 3D-Grafik dargestellt wurden, liegen ebenfalls im Größenbereich der rekonstruierten growth cones. Die Form der Wachstumskegel ist kompakt und häufig anders als die der growth cones

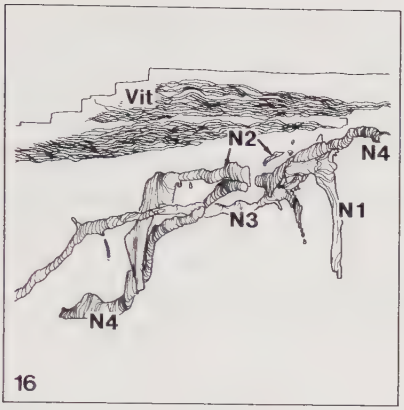


Abb. 16. Orientierungszeichnung der Rekonstruktion SER1. Es sind die identifizierten Neurone N1-N4 und die Vitrea (Vit) dargestellt. Die Zellkörper befinden sich außerhalb des rekonstruierten Bereichs.

von Zellkulturneuronen. Der Wachstumskegel der Faser N1 ist keulenartig, mit wenigen, kurzen Filopodien. Auch der Wachstumskegel der Zelle N2 muß relativ klein sein, da nach einer Lücke von 2 µm (dadurch bedingt, daß hier die beiden Schnittserien zusammenstoßen und ca. 20 Schnitte fehlen) nur noch ein kurzes Filopodium dieser Faser verfolgt werden kann.

Die extrazellulären Räume im rekonstruierten Bereich nehmen 41,7% des Retinavolumens ein und bilden unter der Basallamina ein System von Höhlen, die sich erweitern und verengen; sie stehen untereinander über weitere Hohlräume in Verbindung. Das Hohlraumsystem weist insgesamt wenige kurze Kanäle mit dorsoventraler Vorzugsrichtung, d.h. in Richtung der optischen Fissur auf (Abb. 18b; Pfeile). Sie sind jedoch nicht mit einem System durchgehender und gerichteter Kanäle zu vergleichen. Teilweise erweitern sich die Höhlen auch zu großen extrazellulären Räumen ohne Vorzugsrichtung (Abb. 18b; große Dreiecke). In seltenen Fällen werden die gerichteten Kanäle von Nervenfasern benutzt; im allgemeinen ist keine Beziehung zwischen gerichteten Extrazellulärräumen und dem Verlauf der auswachsenden Axone zu erkennen (Abb. 18b; Sterne).

Die Basallamina wird durch die Ausläufer von Gliazellen, die sich flächig und epithelartig direkt unter der Basallamina ausbreiten, gegen

das extrazelluläre Hohlraumsystem abgeschottet. Keine der identifizierten Nervenfasern hat direkten Kontakt mit der Basallamina; auch die Microspikes, die manchmal auch auf den Axonen zu finden sind (z.B. an der Faser N3), berühren die Basallamina nicht. Die Gliazellausläufer an der Basallamina sind teilweise nur 100-200 µm dick; die Hohlräume reichen dadurch sehr dicht an die Basallamina heran (Abb. 19). Die Nervenfasern verlaufen nicht im vitrealen Teil der extrazellulären Räume, sondern sind ausnahmslos in einem Bereich, der 5-10 µm unter der Basallamina liegt, zu finden (Abb. 19b). Bei der Betrachtung einzelner Schnitte aus SER1 zeigen manche extrazellulären Räume einen auffallend runden Querschnitt (Sterne in den Abb. 19 und 20).

Die Nervenfasern im Hohlraumsystem verlaufen meist im direkten Kontakt mit Gliazellen, die die Wandung der Hohlräume bilden (Abb. 20). Die Axone queren auch die Hohlräume, ohne weiteren Zellkontakt zu haben, jedoch nur über relativ kurze Entfernungen von 2-3 µm. Teilweise verlaufen sie auch zwischen zwei benachbarten Gliazellen, um von einem Hohlraum in einen benachbarten zu wechseln (Abb 20a). Besondere Zellkontakte zwischen den Nervenfasern und den Gliazellen, die sie berühren, sind nicht zu finden.

Kreuzen sich Nervenfasern, bilden sie trotz direkten Kontakts keine besonderen Zell-Zell-Verbindungen aus (Abb. 19b). Die Faser N3 hat direkten Kontakt mit N2 und N4, die Faser N1 berührt N4. Solche Kontakte beeinflussen die Wachstumsrichtung der Fasern nicht (Abb 17). Die Axone N3 und N4, die sich unter einem Winkel von 65° kreuzen, und die Fasern N3 und N2, die in Wachstumsrichtung einen Winkel von 35° bilden, zeigen nach Berührung mit der anderen Faser keine Richtungsänderung.

Die Gliazellen haben teilweise sehr komplexe Formen. Die Gliazellkörper bilden häufig flaschenhalsförmige Ausläufer in vitrealer Richtung, die sich unter der Basallamina mehrfach verzweigen können und als flache, epithelartige Endfüßchen die Basallamina gegen den extrazellulären Raum abdichten (offene Dreiecke in den Abb. 19b, 20a,c). Die Gliazell-Endfüßchen weisen häufig eine dorsoventrale Vorzugsrichtung auf und bilden mit den Endfüßchen anderer Gliazellen eine epithelartige Schicht unter der vitrealen Basallamina. Die Gliazellen bilden fast auf ihrer gesamten Zelloberfläche feine, filopodienartige Ausläufer,

die eine maximale Länge von ca. 1 µm haben. Diese Ausläufer sind meist mit denen benachbarter Gliazellen verzahnt (Abb. 19, 20b,d; Pfeilspitzen). Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind fast nur Querschnitte dieser Strukturen zu sehen. Da die Retinae in nasotemporaler Richtung quergeschnitten sind, haben die filopodienartigen Gliazellfortsätze eine eindeutig dorsoventrale Ausrichtung.

2.2. Rekonstruktionen an 68 Stunden alten Embryonen.

Grundlage für die Rekonstruktionen von 68 Stunden alten Retinae sind zwei Schnittserien aus zwei verschiedenen Augen. Die erste Schnittserie - als SER2 bezeichnet - besteht aus 340 Schnitten, die zweite (SER3) aus 358 Schnitten. Für die durchschnittliche Schnittdicke wurden jeweils 140 nm berechnet. Die rekonstruierten Gewebestücke haben die Ausmaße von ca. 40 µm in nasotemporaler Richtung, 17-19 µm in vitrealer-scleraler und 47 µm bzw. 50 µm für die erste bzw. zweite Schnittserie in dorsoventraler Richtung.

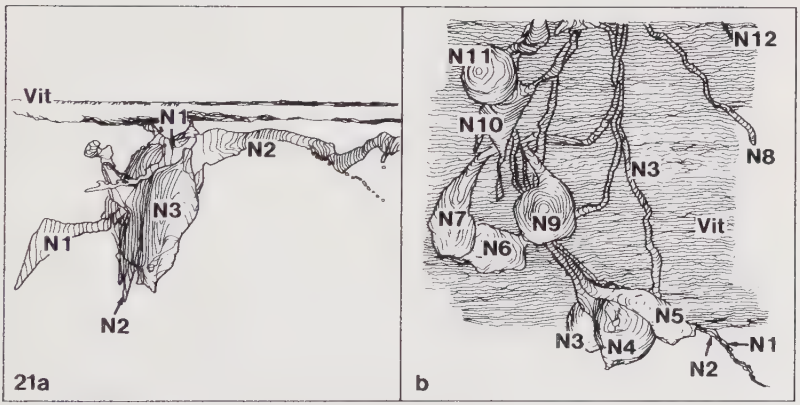


Abb. 21. Orientierungszeichnungen der Rekonstruktionen SER2 und SER3. Die identifizierten Neurone (N1-N3 bzw. N1-N12) und die Vitrea (Vit) sind dargestellt. **a.** SER2. **b.** SER3.

Die Nervenzellen wurden hier ebenfalls anhand morphologischer Kriterien identifiziert. Bei diesen knapp drei Tage alten Retinae sind die Zellkörper innerhalb des rekonstruierten Gewebestücks zu finden, d.h. die Nervenzellkörper liegen näher an der Basallamina als bei den 8 Stunden jüngeren Retinae. Die Nervenzellen bilden in auffallender Weise "Cluster" von zwei bis drei Zellen. Bei SER2 (Abb. 21a) liegen die Zellen N2 und N3 dicht beieinander (Abb. 22, 26c). Die Fasern, die diese beiden Zellen bilden, wachsen voneinander weg, sind aber eindeutig auf die optische Fissur ausgerichtet. Die Faser einer weiteren Zelle (N1), deren Zellkörper scleral außerhalb des rekonstruierten Gewebestücks liegt, verläuft zwischen diesen beiden Zellen und bildet im Bereich von 2-5 μm unter der Basallamina eine Wachstumskegel-ähnliche Struktur mit filopodienartigen Ausläufern, welche teilweise in die Richtung der Nervenfasern der beiden anderen Neurone N2 und N3 wachsen.

Eines dieser Filopodien von N1, das bis dicht unter die Basallamina reicht, ist in der Tasche einer Gliazelle zu finden (Abb. 25a-h). Das lange Filopodium der Zelle N2 wächst ebenfalls in die Tasche einer Gliazelle ein. Derartige Strukturen wurden bereits von Bastiani und seinen Kollegen bei Insekten (Bastiani und Goodman, 1984; Bastiani et al., 1985) als Interaktion zwischen growth cones beschrieben. In vorliegendem Fall jedoch inserieren Filopodien von Axonen in Gliazellen. Vesikelähnliche Strukturen, wie sie von Bastiani und Goodman nachgewiesen wurden, sind in den Gliazellen nicht zu finden. Der Längsschnitt eines Filopodiums in der Tasche einer Gliazelle, dessen Herkunft nicht bestimmt werden konnte, zeigt ebenfalls keine Vesikel im Cytoplasma der Gliazelle, aber eine erhöhte Proteindichte der Gliazellmembran um die Spitze des Filopodiums (Abb. 25j,k). Diese Strukturen sind in der knapp drei Tage alten Retina häufig anzutreffen, in der 60-Stunden-Retina waren sie jedoch nicht zu finden.

Die Nervenzellkörper in SER3 bilden Nester (Abb. 23). N3, N4 und N5 sind benachbarte Zellen; N6, N7 und N9 ebenso wie die Neurone N10 und N11. Die Axone aus einem solchen Neuronenverband können, wie es bei SER2 der Fall ist, in verschiedene Richtungen wachsen, zeigen aber insgesamt eine klare Ausrichtung zur optischen Fissur: Fasern von N3 und N4 (bzw. N5) und Fasern von N6 und N7 wachsen in unterschiedliche Richtungen. Auch können sich Axone von Zellen eines Clusters, die an-

fänglich in direktem Kontakt wachsen, im weiteren Verlauf trennen (N4 und N5).

In der Rekonstruktion SER3 bildet das Axon von N10 einen Wachstumskegel, der einen anderen Zellkörper halb umschließt (Abb. 27a). Ähnliche Verhältnisse sind beim Wachstumskegel N1 in SER2 anzutreffen, dort breitet sich der Wachstumskegel N1 auf dem Neuron N2 und teilweise auch auf N3 aus (Abb. 26c). Nach morphologischen Kriterien ist der Zellkörper in SER3, auf dem sich der Growth cone von N10 befindet, ebenfalls eine Ganglienzelle.

Die Nervenfasern in SER2 und SER3 wachsen, wie bei SER1 beschrieben, in einem bestimmten Bereich unterhalb der Basallamina in den extrazellulären Hohlräumen. Obwohl auch hier die Extrazellularräume bis dicht unter die vitreale Basallamina reichen, sind die Fasern konstant in einer Schicht 3-7 μm unter der Basallamina zu finden (Abb. 27a). Teilweise laufen Nervenfasern über kurze Entfernungen von 1-2 μm in Einbuchtungen von Gliazellen oder werden von diesen ganz umschlossen (Abb. 26b, 27c). Zell-Zell-Verbindungen zwischen Nervenfaser und umschließender Gliazelle sind in diesen Bereichen nicht zu beobachten.

Die bei SER1 beschriebenen filopodienartigen Gliazellfortsätze sind auch bei den 8 Stunden älteren Retinae zu finden. Sie verlaufen manchmal in unmittelbarer Nachbarschaft von Axonen (Pfeilspitzen in den Abb. 26b und 27c). Insgesamt ist die Anzahl dieser Fortsätze in der 68-Stunden-Retina deutlich geringer. Die Form der Gliazellen kann ebenso wie bei der jüngeren Retina sehr komplex sein; die Endfüßchen verzweigen sich häufig sehr stark und bilden flache, epithelartige Ausläufer unter der Basallamina (offene Dreiecke in den Abb. 26c, 27a).

Die Fasern der Zellen N3, N6 und N7 wachsen zu einem Nervenfaserbündel zusammen; die Axone sind dabei ineinander verdrillt (Abb. 23). Die Faser N7 verläßt das Bündel jedoch wieder nach kurzer Distanz und nähert sich dem Axonbündel, das aus den Fasern von N1, N2, N4, N9 und N11 besteht. Die Axone N3, N6 und N8 beginnen ebenso ein Faszikel zu bilden wie N5, N10 und N12. Insgesamt ist bei den Fasern bereits nach kurzer Entfernung vom Zellkörper die Tendenz zur Faszikulation zu beobachten, wobei einzelne Fasern auf ihrem Weg zur optischen Fissur das

Bündel wechseln (N7) oder Bündel kreuzen, diese jedoch ignorieren und zu einem anderen wachsen können (N12).

Jüngere Axone sind meist dicker als ältere Axone. Dies ist an den Fasern mit Wachstumskegeln zu erkennen: Die Axone in SER1, SER2 und das Axon N10 in SER3 haben eine wesentlich größeren Durchmesser als die restlichen Axone in SER3, deren Wachstumskegel bereits außerhalb des rekonstruierten Gewebestücks liegt.

Die extrazellulären Räume im rekonstruierten, zentralen Retinabereich von SER3 nehmen 30,3% des Gewebevolumens ein. Das teilweise bis dicht unter die Basallamina reichende extrazelluläre Hohlraumsystem weist in diesem Entwicklungsstadium ebenfalls nur wenige, relativ kurze, zur optischen Fissur ausgerichtete Kanäle auf (Abb. 24a), die sich in einzelnen Fällen mit dem Verlauf der auswachsenden Fasern decken (Abb. 24b). Große extrazelluläre Hohlräume sind nicht mehr vorhanden. Die schwammartige Struktur der Hohlraumsystems ist immer noch erkennbar und im Prinzip ähnlich dem der jüngeren Retina; die Extrazellularräume werden aber deutlich kleiner (Abnahme des Volumens von 41,7 auf 30,3%).

2.3. Einzelaufnahmen von Retinae 77-78 Stunden alter Embryonen.

Einzelaufnahmen aus dem zentralen Bereich von 77-78 Stunden alten Wachtel-Retinae zeigen unter der vitrealen Basallamina Nervenfaserbündel, die aus bis zu 60-80 Einzelfasern bestehen (Abb. 28). Die extrazellulären Räume sind wesentlich kleiner als bei den 10 Stunden jüngeren Retinae. Es sind nur noch wenige Hohlräume zu erkennen.

Der Abstand der Faszikel von der Basallamina beträgt mindestens 0,5 μm und höchstens 3,5 μm. Keine der Nervenfasern hat direkten Kontakt mit der Basallamina; diese ist von flachen Gliazell-Endfüßchen epithelartig bedeckt. Vereinzelt sind Axone zu beobachten, die die Faserbündel queren (Abb. 28a; Pfeilspitzen). Im scleralen Teil der Faszikel sind meist dünne Axone von 150-300 nm Durchmesser zu finden, im vitrealen Teil sind die Axone größtenteils dicker und haben teilweise die Morphologie von Wachstumskegeln (Abb. 28a; Sterne).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der einzelnen Entwicklungsstadien können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- Die untersuchten und rekonstruierten Wachstumskegel sind klein (max. Ausdehnung mit Filopodien: ca. 10 µm) und zeigen unterschiedliche Formen.

- Axone wachsen bereits kurz nach Verlassen des Zellkörpers in einem bestimmten Abstand zur Basallamina in die Richtung der optischen Fissur; der Abstand ist typisch für das jeweilige Entwicklungsstadium.

- Keine der identifizierten und rekonstruierten Nervenfasern oder deren Filopodien berühren die Basallamina.

- Auswachsende Axone, die sich kreuzen, haben immer direkten Kontakt miteinander; dies hat jedoch keinen morphologisch sichtbaren Einfluß auf ihre Wachstumsrichtung.

- Die vitreale Basallamina ist überall von Gliazellen oder flachen, epithelartigen Gliazell-Endfüßchen bedeckt.

- Unterhalb der vitrealen Basallamina sind große extrazelluläre Räume mit schwammartiger Struktur zu finden.

- Das extrazelluläre Hohlraumsystem enthält wenige und nur kurze Kanäle, die zur optischen Fissur ausgerichtet sind; diese Kanäle werden in wenigen Fällen von den auswachsenden Axonen benutzt.

- Das Volumen der extrazellulären Hohlräume nimmt bei den untersuchten Entwicklungsstadien mit zunehmendem Alter deutlich ab (von 41,7 auf 30,3% des Volumens); die schwammartige Strukturierung bleibt jedoch erhalten.

- Ganglienzellen bilden Verbände von mehreren Zellen, deren Axone sich individuell ihren Weg zur optischen Fissur suchen.

- Die Somata der Ganglienzellen wandern während der untersuchten Entwicklungsstadien aus tieferen Schichten der Retina in vitreale

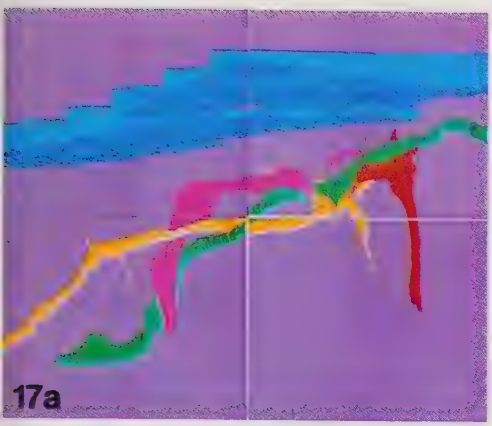
Richtung.

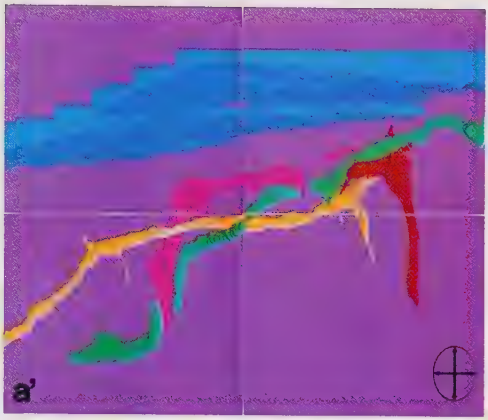
- Axone werden teilweise über kurze Strecken von ca. 0,5 µm von benachbarten Gliazellen umschlossen.

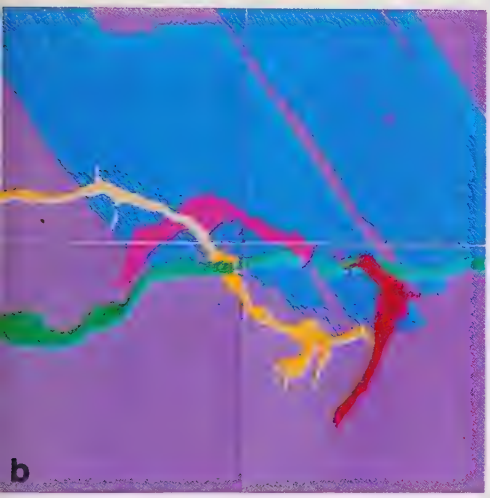
- Ab Embryonaltag 3 (E3) können Filopodien von auswachsenden Axonen beobachtet werden, die in Taschen von Gliazellen einwachsen.

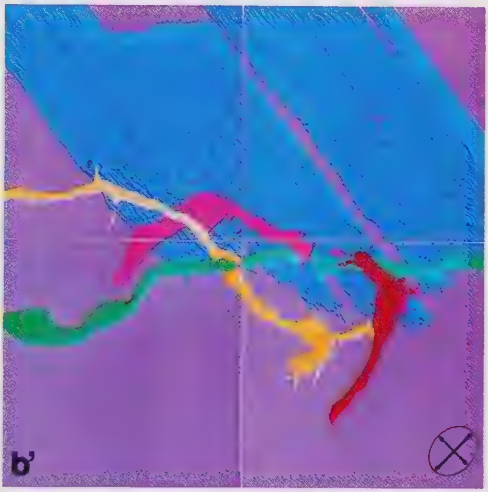
- Gliazellen bilden viele kurze filopodienartige Zellfortsätze vornehmlich in dorsoventraler Ausrichtung.

Abb. 17. 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER1: Neurone und Vitrea. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 60 Std. nach Inkubation. Isolierte Darstellung der identifizierten Nervenfasern und der Vitrea (sh. Abb. 16); Stereobilder. **a, a'.** Rotation 90°/-45° und -40°. **b, b'.** Rotation 45°/-45° und -40°. **c, c'.** Rotation 0°/5° und 0°.
Farben: N1 = rot, N2 = pink, N3 = gelb, N4 = grün, Vitrea = blau, Hintergrund = graublau.


17a


a'


b


b'

c

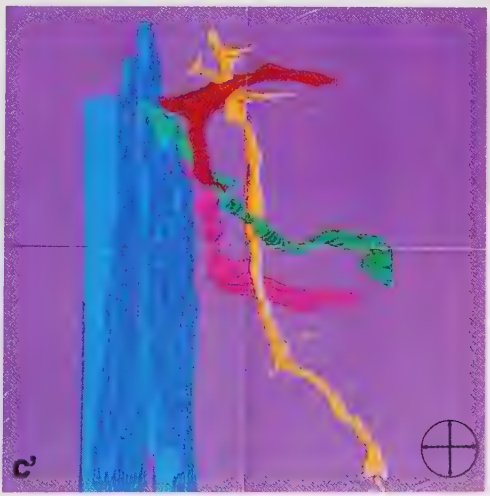
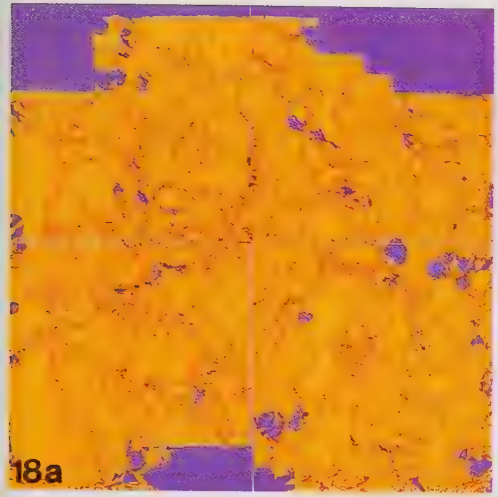
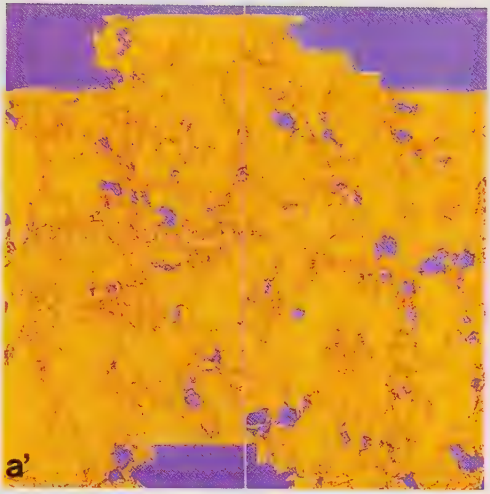

c'

Abb. 18. 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER1: extrazellulärer Raum und Neurone. Wachtelretina, zentraler Bereich; 60 Std. nach Inkubation. **a,a'.** Isolierte Darstellung der extrazellulären Räume aus vitrealer Richtung; Stereobild. Rotation 0°/115° und 110°. **b.** Darstellung der extrazellulären Räume und der Neurone (Übereinander-Projektion von extrazellulären Räumen und Neuronen desselben Ausschnitts). Gerichtete extrazelluläre Räume (Pfeile) und große Hohlräume ohne Vorzugsrichtung (Dreiecke) sind zu erkennen. Bereiche, in denen Nervenfasern in gerichteten Extrazellulärräume verlaufen, sind mit Sternen gekennzeichnet. Die Lage der optischen Fissur (OF) ist mit dem großen Pfeil angegeben. Rotation 0°/115°.
Farben: **a,a'.** extrazellulärer Raum = gelb, Hintergrund = graublau. **b.** extrazellulärer Raum = braun, Hintergrund = blau, Neurone = restl. Farben.


18a


a'

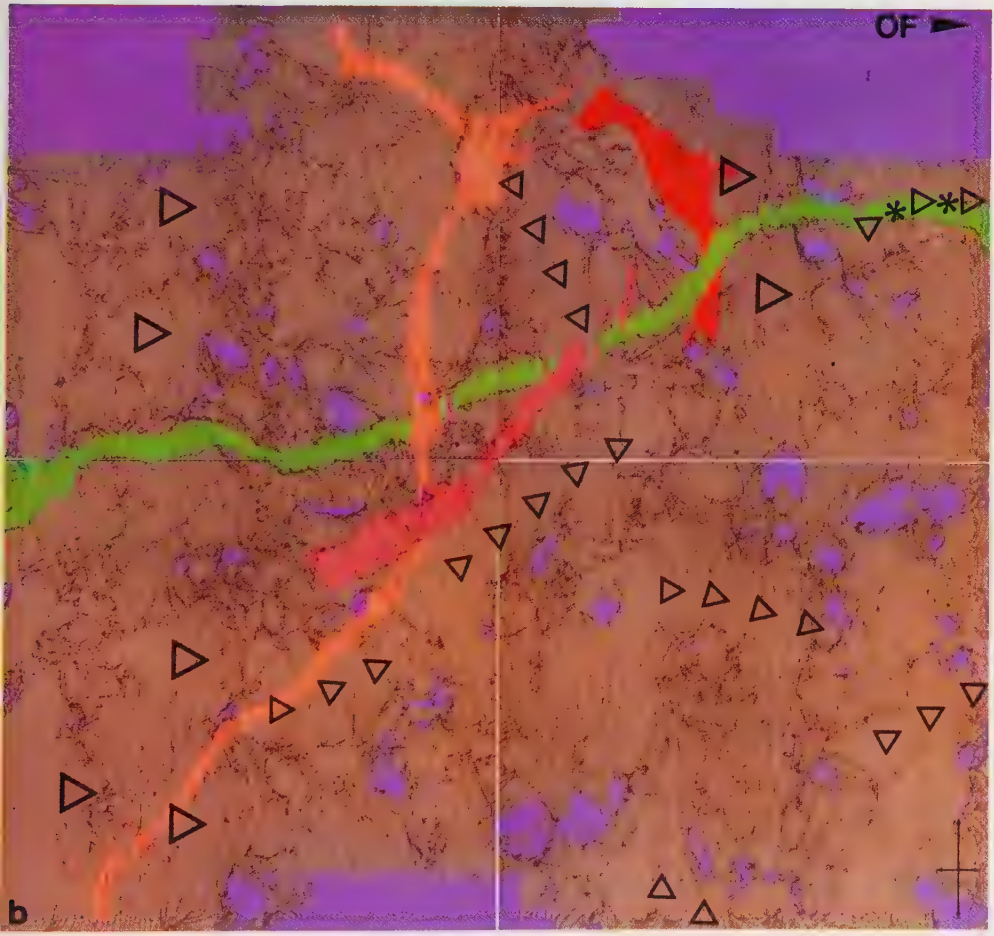

OF
b

Abb. 19. EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER1. Wachtel-Retina, 60 Std. nach Inkubation. Basallamina am oberen Bildrand. Die Bezeichnung der Neurone entspricht denen der Rekonstruktion. **a.** Schnitt 1. Im Kontakt mit Gliazellen ist der Wachstumskegel der neuronalen Faser N1 zu erkennen. Die extrazellulären Hohlräume sind groß und reichen oft bis dicht unter die Basallamina. Diese ist jedoch immer von flachen Gliazellausläufern bedeckt, die teilweise nur 100 nm dick sind. Sterne markieren extrazelluläre Räume mit auffallend rundem Querschnitt. Pfeilspitzen weisen auf Querschnitte von feinen, filopodienartigen Gliazellausläufern hin. **b.** Schnitt 230. In diesem Bereich quert die Faser N2 die Nervenfasern von N1 und N3 und hat hier direkten Kontakt mit N1. Pfeilspitzen deuten wieder auf die überall vorhandenen Gliazellausläufer hin. Flache, epithelartige Gliazell-Endfüßchen sind mit offenen Dreiecken gekennzeichnet.

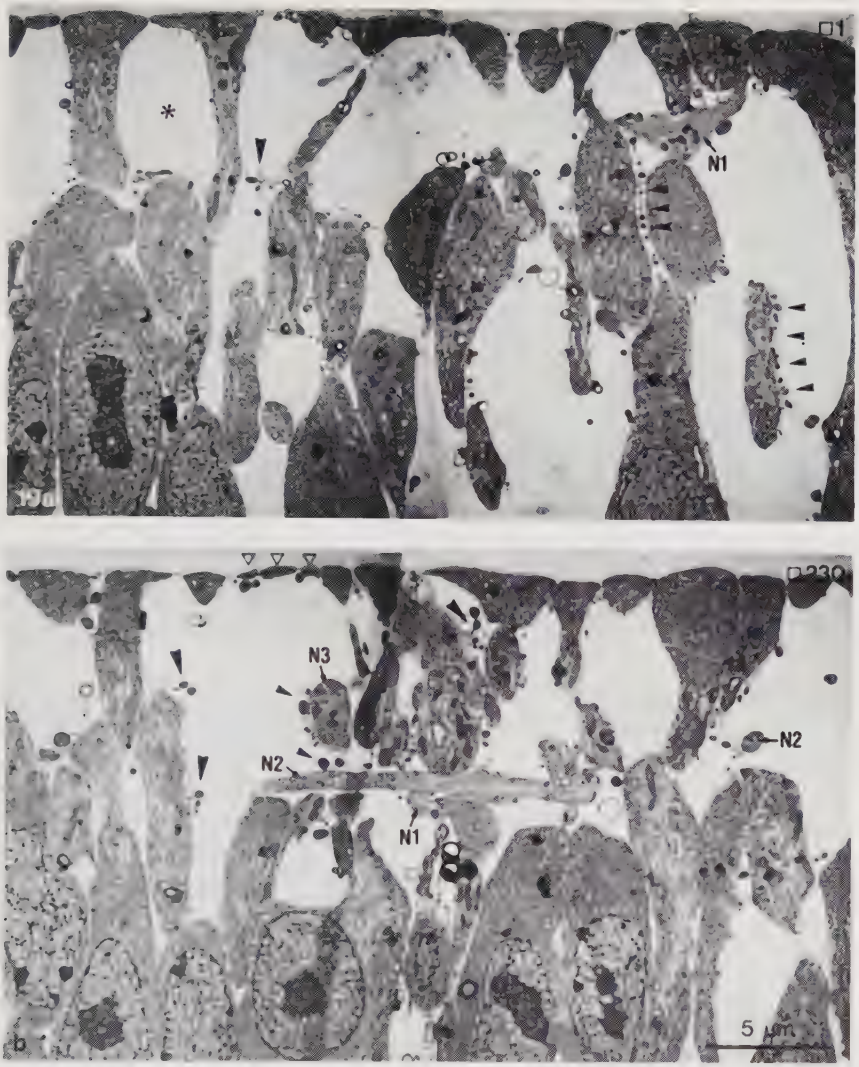

□1
N1
□230
N3
N2
N2
N1
5 μm

Abb. 20. EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER1. Wachtel-Retina, 60 Std. nach Inkubation. Basallamina am oberen Bildrand. Pfeilspitzen weisen auf feine Gliazellfortsätze hin. Flache, epithelartige Gliazell-Endfüßchen sind mit offenen Dreiecken gekennzeichnet. Sterne markieren extrazelluläre Räume mit auffallend rundem Querschnitt. Die Bezeichnung der Neurone entspricht denen der Rekonstruktion. **a, b.** Schnitt 190. Die Nervenfasern N1 und N3 befinden sich zwischen zwei benachbarten Gliazellen. In unmittelbarer Umgebung befinden sich große extrazelluläre Räume, die bis dicht unter die Basallamina reichen. **c, d.** Schnitt 198. Ungefähr 1,5 μm in dorsaler Schnittrichtung ist die Gliazelle G nur noch peripher getroffen. Querschnitte feiner Zellfortsätze dieser Gliazelle sind zu sehen (große Pfeilspitzen in Abb. d). Die neuronalen Fasern N1 und N3 verlaufen wieder in der Peripherie der extrazellulären Hohlräume.

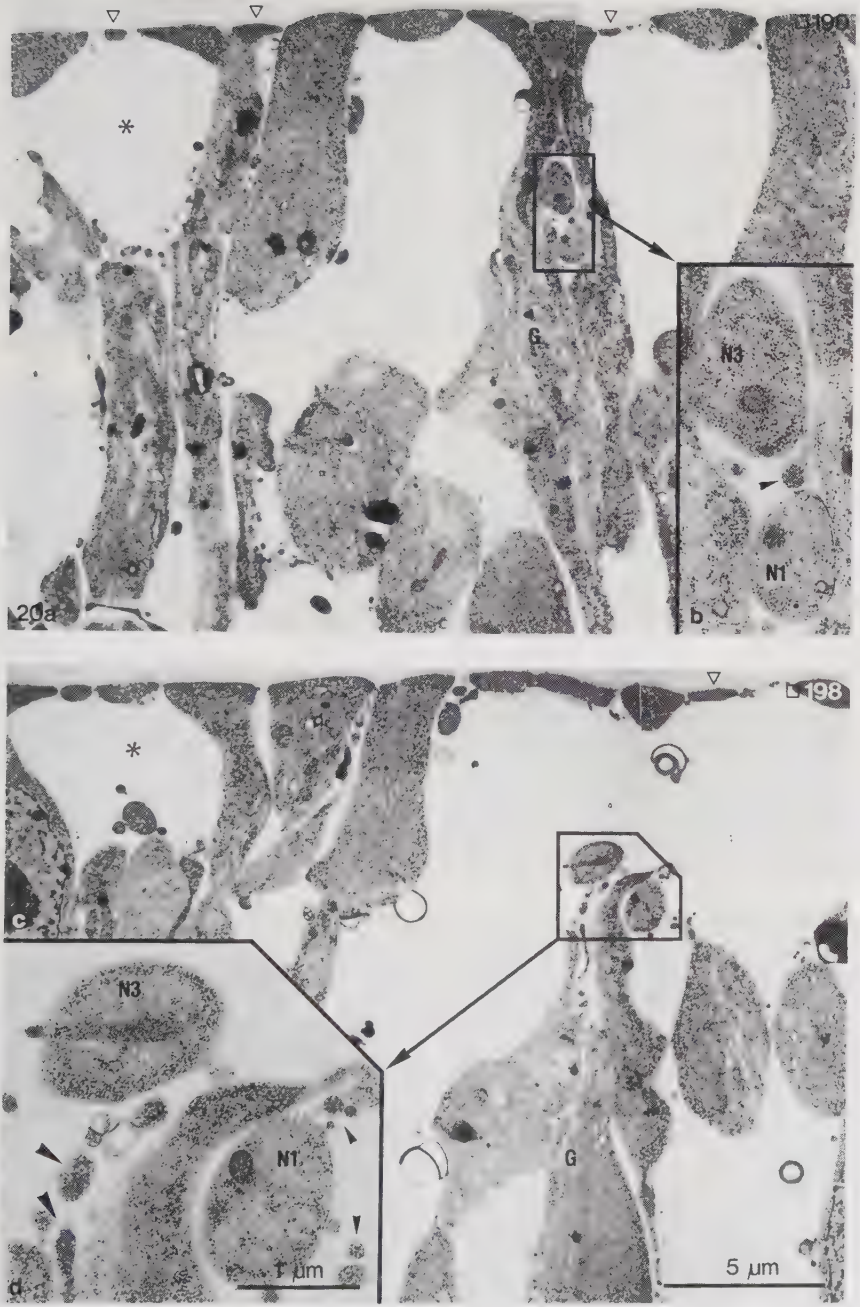

199
G
N3
N1
20a
b
198
c
N3
N1
G
1 µm
5 µm
d

Abb. 22. 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER2: Neurone und Vitrea. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. Isolierte Darstellung der identifizierten Neurone N1-N3 und der Vitrea (sh. Abb. 21a); Stereobilder. **a, a'.** Rotation 90°/-45° und -40°. **b,** b'. Rotation 45°/-40° und -35°. **c, c'.** Rotation 0°/-5° und 0°. Farben: N1 = rot, N2 = pink, N3 = gelb, Vitrea = blau, Hintergrund = graublau.

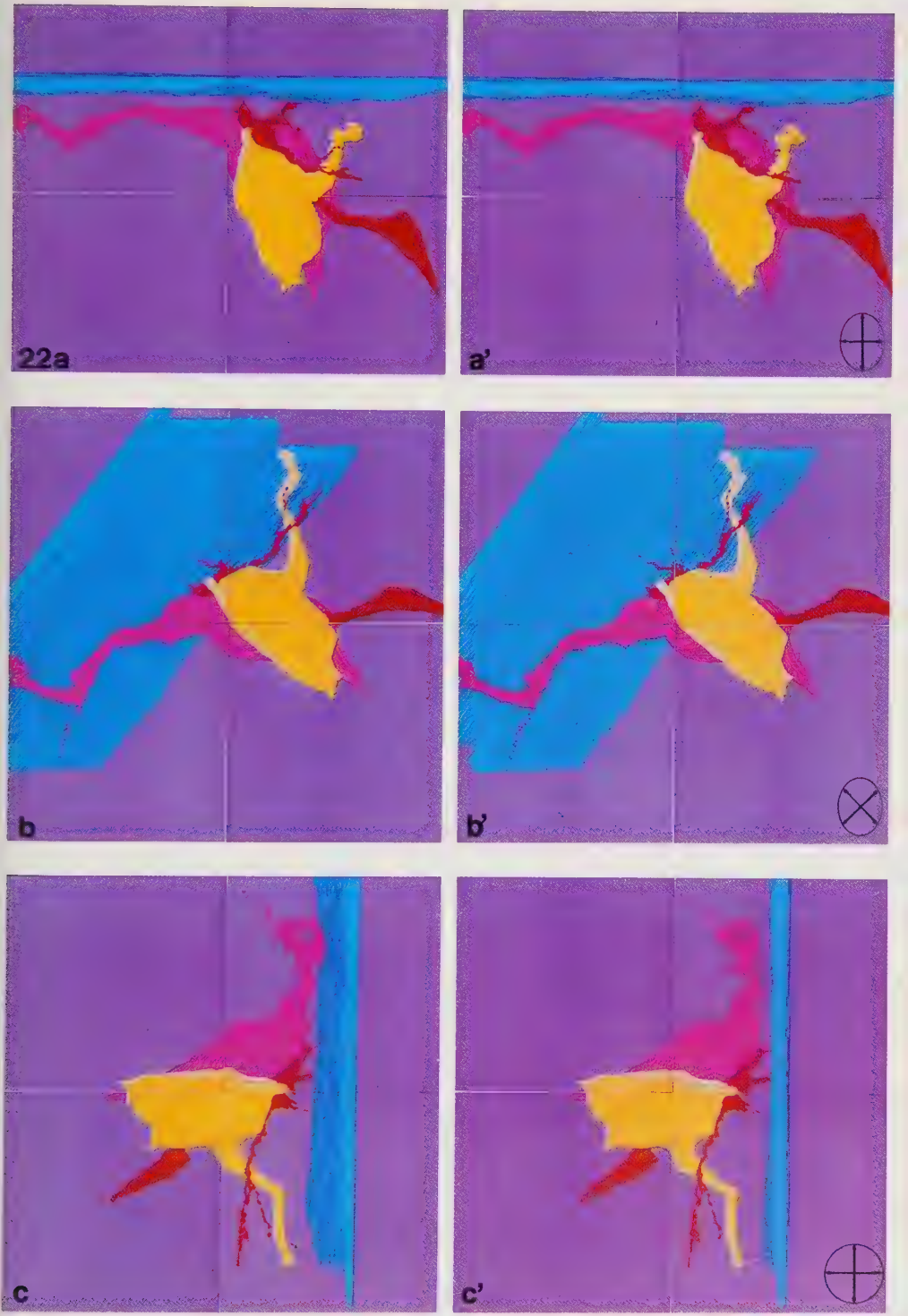

22a
a'
b
b'
c
c'

Abb. 23. 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER3: Neurone und Vitrea. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. Isolierte Darstellung der identifizierten Neurone N1 - N12 und der Vitrea (sh. Abb. 21b); Stereobilder. **a, a'.** Rotation 90°/35° und 40°. **b, b'.** Rotation 0°/-40° und -35°. **c, c'.** Rotation 0°/20° und 25°.
Farben: N1 = weiß, N2 = pink, N3 = gelb, N4 = grün, N5 = hellbraun, N6 = braun, N7 = kräftiges pink, N8 = rot, N9 = rot, N10 = helles cyan, N11 = gelb, N12 = pink, Vitrea = blau, Hintergrund = graublau.

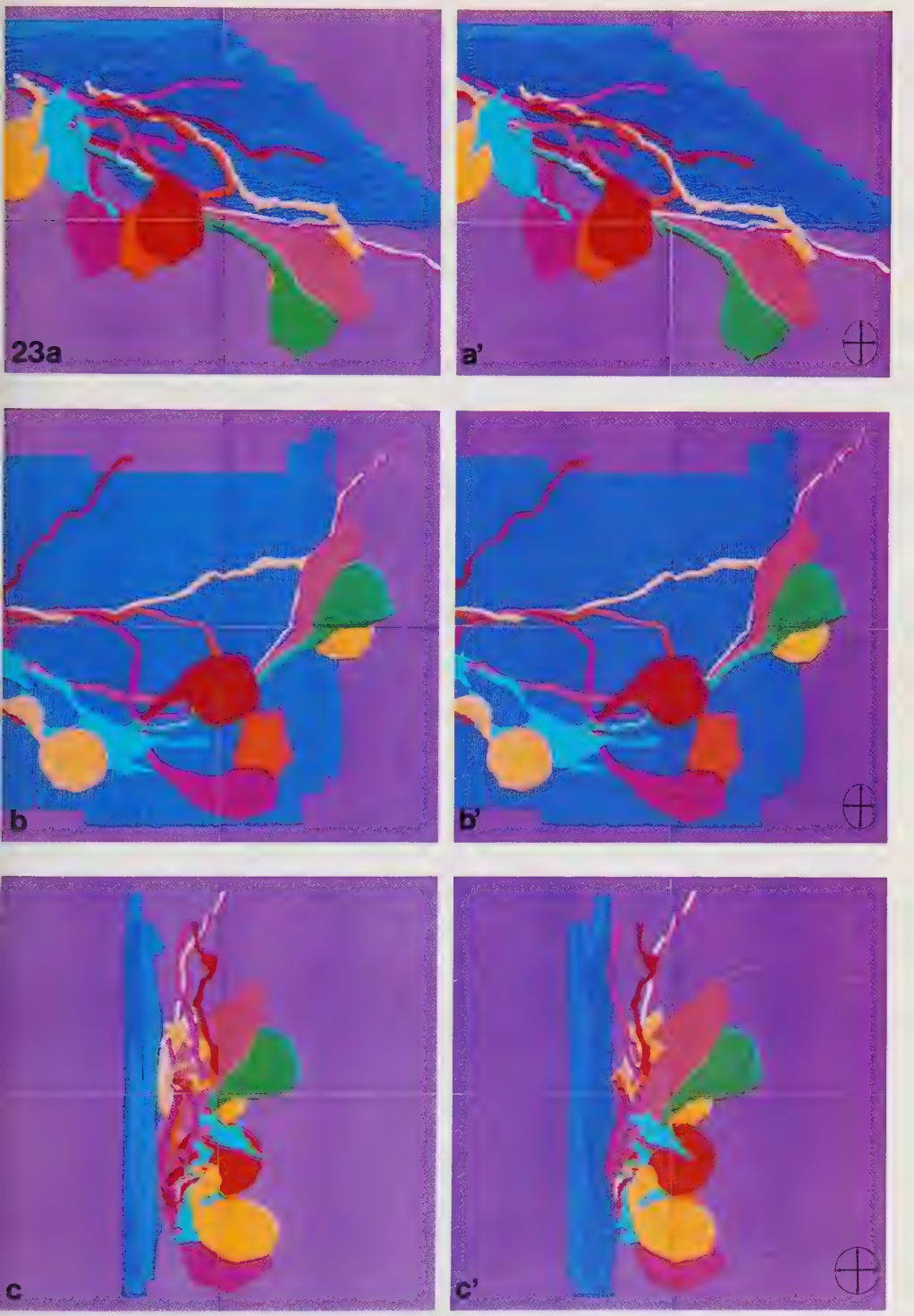
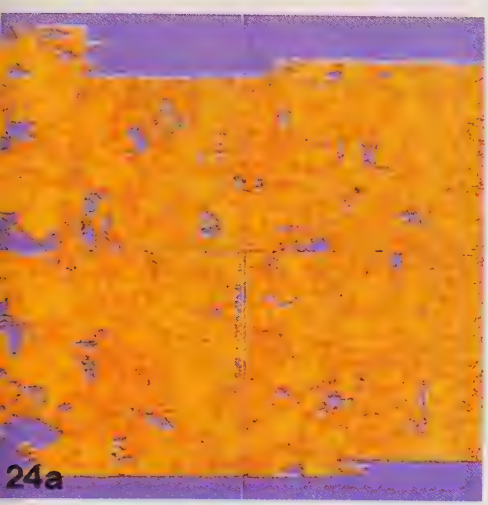
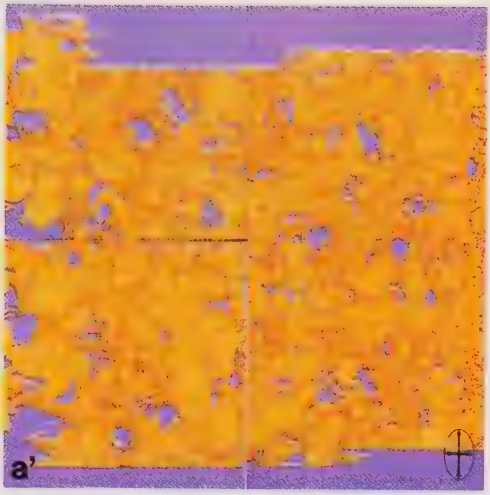

23a
a'
b
b'
c
c'

Abb. 24. 3D-Computergrafik der Rekonstruktion SER3: extrazellulärer Raum und Neurone. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. **a,a'.** Isolierte Darstellung der extrazellulären Räume aus vitrealer Richtung; Stereobild. Rotation 0°/125° und 120°. **b.** Darstellung der extrazellulären Räume und der identifizierten Neurone (Übereinander-Projektion von zellulären Räumen und Neuronen desselben Ausschnitts). Gerichtete extrazelluläre Räume sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Verlauf der Nervenfasern und der gerichteten Hohlräume decken sich teilweise. Die Lage der optischen Fissur (OF) ist durch den großen Pfeil angedeutet. Rotation 0°/125°.
Farben: wie in Abb. 18.


24a


a'

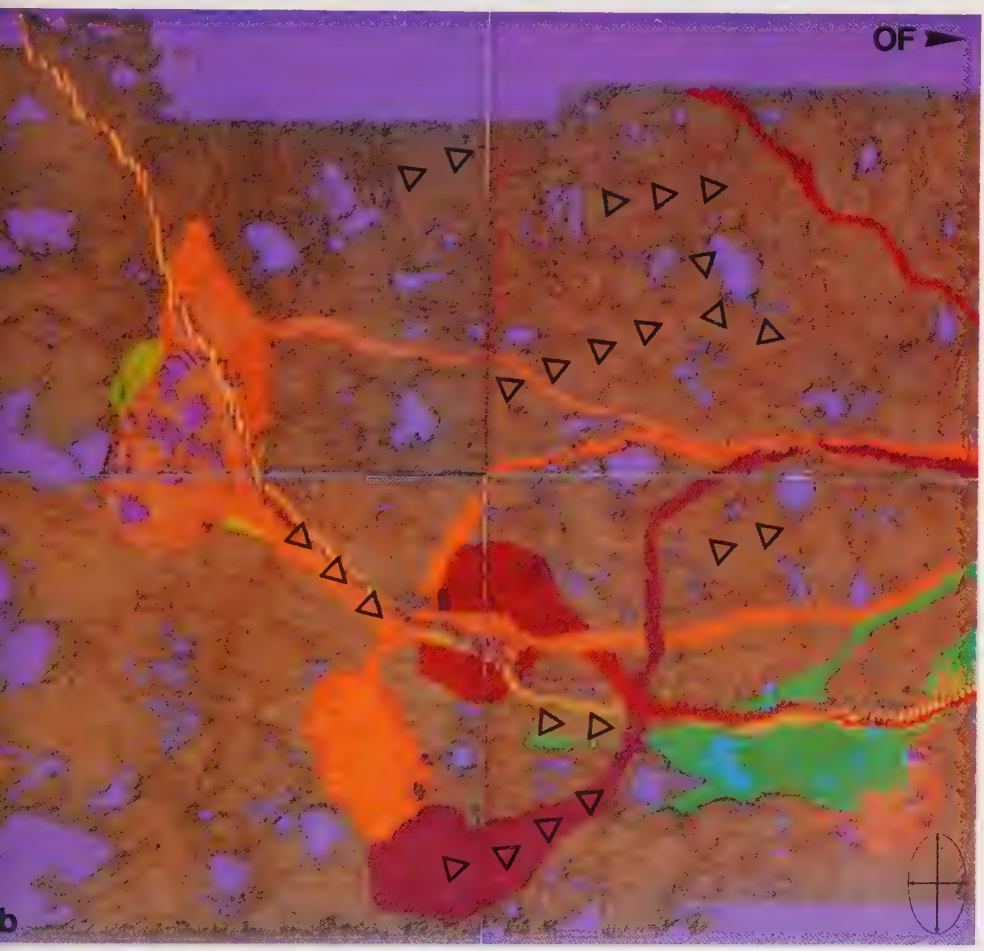
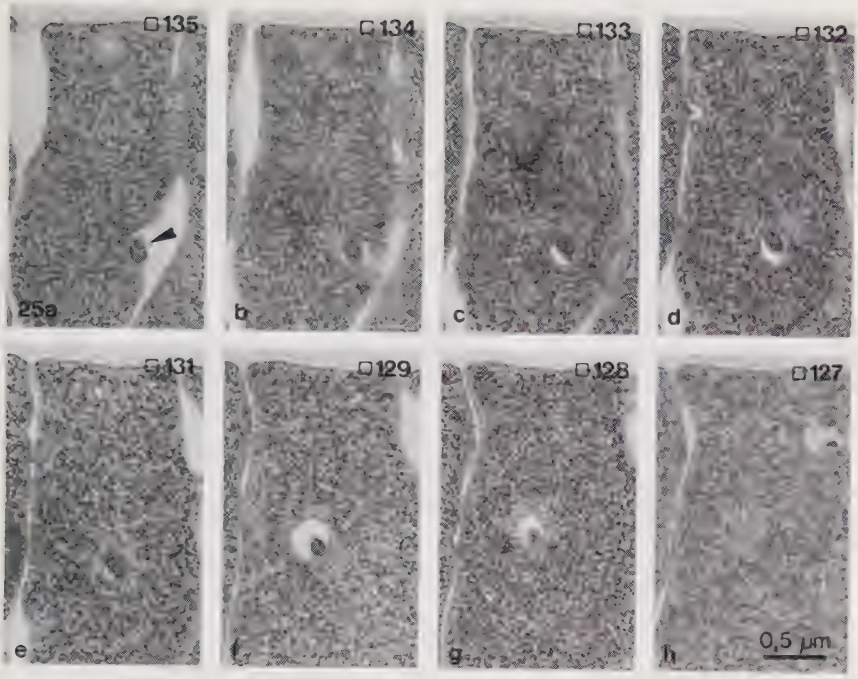

OF
b

Abb. 25. EM-Aufnahmen von inserierenden Filopodienstrukturen (SER2). Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. Basallamina jeweils am oberen Bildrand. Die Bezeichnung der Neurone entspricht denen der Rekonstruktion. **a-h.** Ein Filopodium des Neurons N1, das bis knapp unter die Basallamina reicht, wächst in die Tasche einer Gliazelle ein (Pfeil in Abb. a). Das Filopodium kann in der Gliazelle von Schnitt 127 bis Schnitt 135 verfolgt werden. **j-k.** Der Längsschnitt eines inserierenden Filopodiums zeigt eine auffallend geringe Elektronendichte im Cytoplasma der Gliazelle um die Tasche herum, jedoch in der Nähe der Filopodienspitze elektronendichteres Material in der Gliazellmembran.


135
134
133
132
25a
b
c
d
131
129
128
127
e
f
g
h
0,5 µm

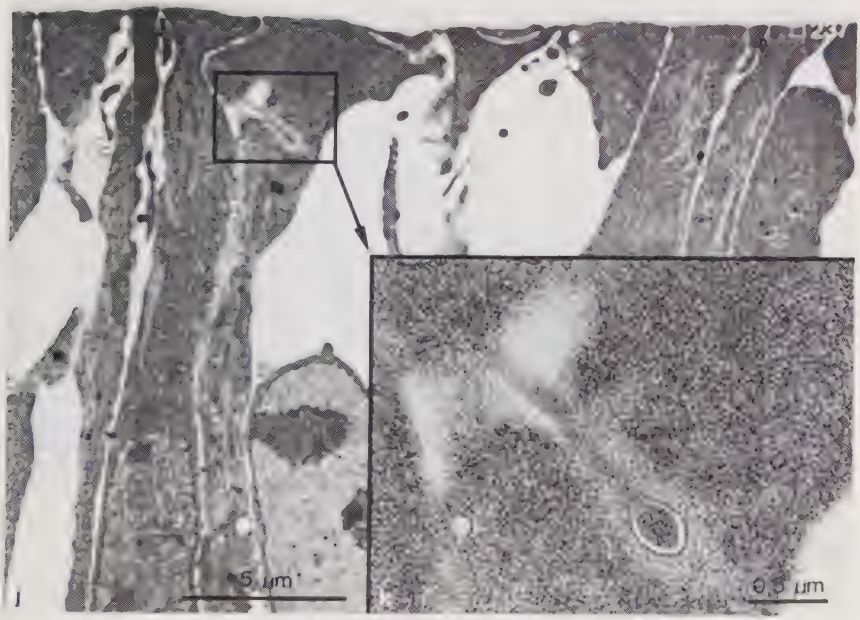
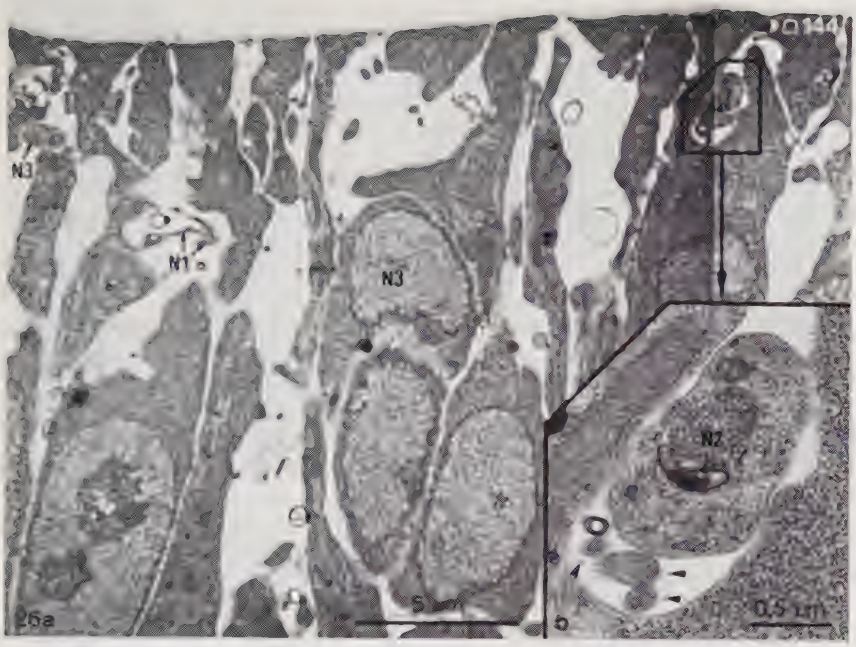

i
5 µm
k
0,5 µm

Abb. 26. EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER2. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. Basallamina jeweils am oberen Bildrand. Die Bezeichnung der Neurone entspricht denen der Rekonstruktion. **a, b.** Schnitt 144. Relativ große extrazelluläre Räume, insbesondere unter der Basallamina sind zu sehen. Die Neurone N1 und N3 wachsen jedoch in zelldichteren Bereichen zwischen Gliazellen. Die Nervenfaser N2 wird von einer Gliazelle fast vollständig umschlossen. In diesem Gliazell-"Kanal" wachsen außerdem feine Zellfortsätze anderer Gliazellen (Pfeilspitzen in Abb. b). **c.** Schnitt 171. Der Wachstumskegel der Nervenzelle N1 wächst dicht an den Zellkörpern der Neurone N2 und N3 und umschließt diese teilweise. Neuron N3 bildet ein Axon, das in vitreale Richtung wächst und sich dabei von N1 und N2 entfernt. Offene Dreiecke deuten auf flache Gliazell-Endfüßchen hin.


N3
N1
N3
N2
26a
5 µm
b
0,5 µm

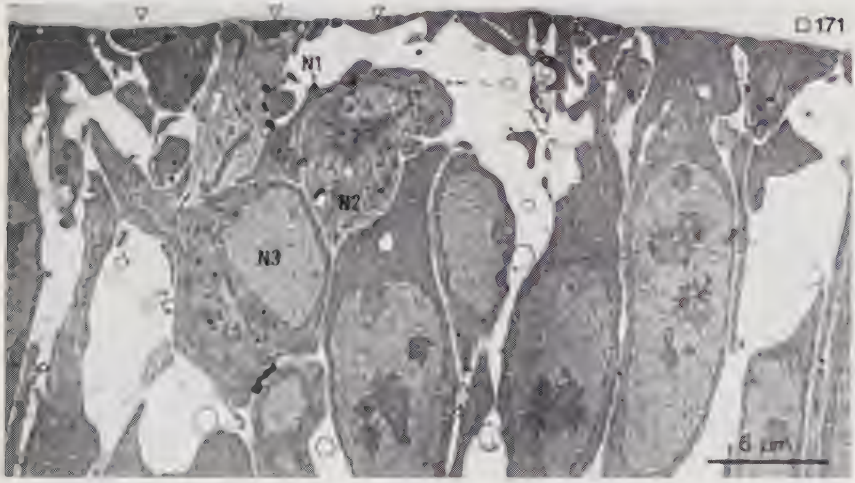
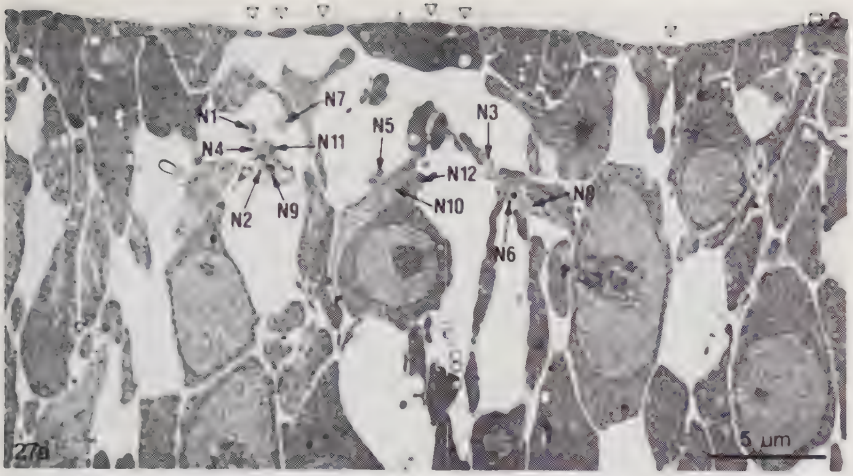

171
N1
N2
N3
6 µm

Abb. 27. EM-Aufnahmen einzelner Schnittebenen aus SER3. Wachtel-Retina, zentraler Bereich; 68 Std. nach Inkubation. Basallamina jeweils am oberen Bildrand. Die Bezeichnung der Neurone entspricht denen der Rekonstruktion. **a.** Schnitt 2. Am ventralen Ende der Schnittserie (d.h. in Richtung der optischen Fissur) wird die Tendenz zur Bündelung der Fasern deutlich. Zum mittleren Bündel gehört neben N5 und N12 auch die Faser N10, die einen Wachstumskegel bildet. Dieser umschließt teilweise das Soma einer Zelle mit der typischen Morphologie einer Ganglienzelle. Die Basallamina wird teilweise nur durch flache Gliazell-Endfüßchen (offene Dreiecke) von den relativ großen extrazellulären Räumen getrennt. **b, c.** Schnitt 104. Zwei Nervenfaserbündel sind zu erkennen, wobei eines vollständig von einer Gliazelle umschlossen wird. In direkter Nachbarschaft dieser umschlossenen Axone befinden sich filopodienartige Gliazellausläufer (Pfeilspitzen in Abb. c), die parallel zu den Axonen verlaufen.


N1
N7
N5
N3
N4
N11
N12
N2
N9
N10
N8
N6
27a
5 µm

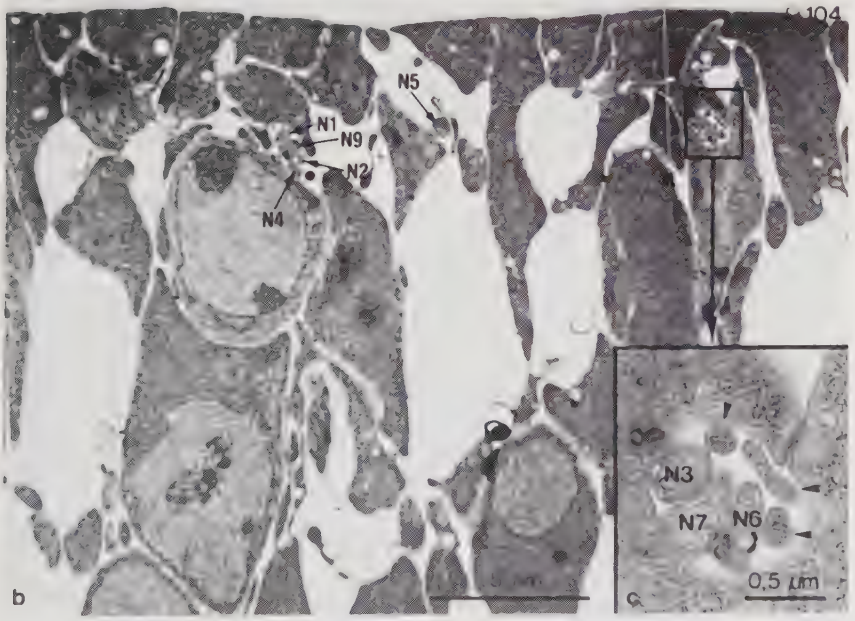
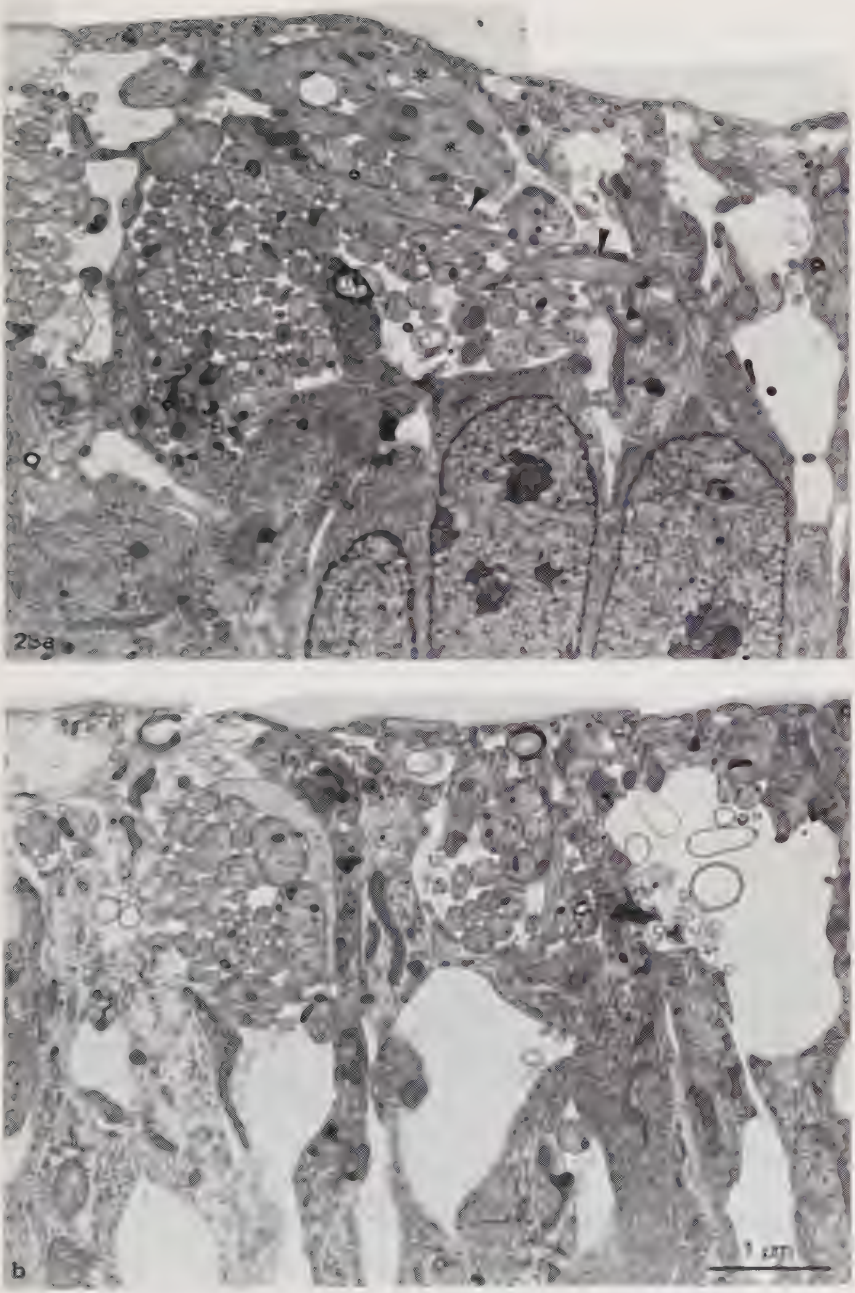

N5
N1
N9
N2
N4
N3
N7
N6
b
0,5 µm

Abb. 28. EM-Aufnahmen an Einzelschnitten von 77-78 Stunden alten Wachtel-Retinae. Zentraler Retinabereich. Basallamina jeweils am oberen Bildrand. **a.** Die extrazellulären Räume sind wesentlich kleiner als bei den 10 Std. jüngeren Retinae. Es haben sich größere Nervenfaserbündel gebildet, die sich 0,5 bis 3,5 μm unterhalb der Basallamina befinden. Keines der Axone hat Kontakt mit der Basallamina. Es sind quer zur Faszikelrichtung verlaufende Axone zu beobachten (Pfeilspitzen in Abb. a). Im vitrealen Teil der Nervenfaserbündel sind Growth cones bzw. Wachstumskegel-ähnliche Strukturen zu sehen (Sterne in Abb. a). **b.** Unmittelbar benachbarter Bereich des in Abb. a gezeigten Ausschnitts.


2b a
b
1 µm

IV. DISKUSSION

Die Gefrierfixierungs- und Gefriersubstitutionsversuche zeigen, daß nur wenige der getesteten Substanzen als Gefrierschutzmittel für embryonales Nervengewebe geeignet sind, um seine Ultrastruktur zu erhalten. Alle "klassischen" Gefrierschutzmittel verursachen erhebliche Strukturveränderungen: hochmolekulare, nichtpenetrierende Agentien wie PVP und Dextran dringen zu langsam oder überhaupt nicht in das Gewebe ein und schützen damit nicht vor Gefrierfixierungsartefakten. Glycerin und Äthylenglycol sind ebenfalls nicht geeignet, da sie im Gewebe einen ausgeprägten osmotischen Effekt zeigen: die Zellen schrumpfen bei kurzzeitiger Inkubation, die interzellulären Spalten sind nach 3-stündiger Inkubation noch immer vergrößert. Dies spiegelt offenbar die Dynamik der Penetration wieder. Die Gefrierschutzmittel verursachen einen starken Wasserentzug der Zellen. Im Laufe der Zeit "normalisiert" sich mit der Penetration z.B. von Glycerin der Wassergehalt der Zellen wieder. DMSO ist mit Einschränkungen zu verwenden: nur nach chemischer Vorfixierung sind die Gewebestrukturen stabilisiert und die Membranen für DMSO offensichtlich so permeabel, daß die Inkubation im Gefrierschutzmittel die Größe der Zellen und der extrazellulären Räume nicht erkennbar verändert.

Ein als Gefrierschutzmittel ungewöhnliches Agens, DMF, lieferte die besten Ergebnisse in der Strukturerhaltung. DMF kann als nahezu ideales Gefrierschutzmittel angesehen werden, da es einen ausgezeichneten Gefrierschutz bietet, sehr schnell penetriert (100 μm sind in weniger als 30 min durchdrungen), die Gewebeultrastruktur nicht beeinflußt und die Wirkung der Fixierungsmittel nicht stört. Dies liegt wahrscheinlich an der wasserähnlichen Molekülstruktur von DMF (kleines Molekül mit Dipol-Charakter), so daß in gewissen Grenzen das Zellwasser durch DMF ersetzt werden kann, ohne ultrastrukturelle Veränderungen zu verursachen.

Für morphologische Untersuchungen an eingebetteten Proben, wo ausgezeichnete Strukturerhaltung notwendig ist, spielt es keine Rolle, ob das Gefrierschutzmittel toxisch ist oder ob es für Gefrierbruch-Methoden geeignet ist. Es ist wichtig, daß während der Infiltration

mit Gefrierschutzmittel keine Strukturveränderungen auftreten. Es mag sein, daß z.B. Glycerin "sehr einfach in der Handhabung ist, die durch Glycerin verursachten Artefakte sehr ausführlich dokumentiert sind und die Ergebnisse, die mit Glycerin erzielt werden, mit der bereits vorhandenen Fülle an Daten verglichen werden können" (Skaer, 1982); trotzdem wird die Strukturerhaltung von embryonalem Nervengewebe durch die Verwendung von Glycerin als Gefrierschutzmittel nicht besser.

Eine chemische Vorfixierung tut den Vorteilen der Gefriersubstitution keinen Abbruch, wenn es für morphologische Untersuchungen der Verbesserung der Strukturerhaltung dient. Der Einfluß von Formaldehyd während der Vorfixierung führt zu verbesserter Strukturerhaltung von Mitochondrien oder zumindest zu einem kompakteren Erscheinungsbild mit dichterer Matrix verglichen mit Mitochondrien, die nur mit Glutaraldehyd vorfixiert wurden. Dies zeigt das allgemeine Problem, daß es manchmal nicht möglich ist, anhand der derzeitigen Daten zu entscheiden, welches Erscheinungsbild den in-vivo-Verhältnissen eher entspricht. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Karnovsky (1965), was die allgemein bessere Strukturerhaltung in GA/FA-Mischungen betrifft; die hohe Osmolarität der Fixierungslösungen jedoch, wie sie von Karnovsky verwendet wurden, verursacht - zumindest in embryonalem Nervengewebe - auch bei Perfusionsfixierung erhebliche Schrumpfungsartefakte. Die geeignete Osmolarität der Pufferlösungen ist mit eine wichtige Voraussetzung für gute Gewebestrukturerhaltung (Beaulaton und Gras, 1980; Meißner, 1983; Stoner und Sirak, 1969).

Die Anforderungen, die an eine Serienschnitt-Methode gestellt werden, sind vom Ziel der Untersuchungen abhängig. Für die dreidimensionale Rekonstruktion sehr feiner, neuronaler Strukturen wie z.B. Filopodien mit weiträumiger, komplexer Ausdehnung ist es notwendig, große Serien von mehreren hundert Schnitten herzustellen. Die Schnitte müssen dabei faltenfrei auf den Trägerfilm der Grids übertragen werden können, da eine relativ großflächige Auswertung der Schnitte notwendig ist und Falten später das Alignment der aufeinanderfolgenden Aufnahmen zumindest erheblich erschweren. Verluste von Schnitten müssen ebenfalls weitgehend ausgeschlossen sein, da sonst feine Strukturen wie Filopodien nicht mehr zuverlässig verfolgt werden können.

Mit der beschriebenen Serienschnitt-Methode ist das Risiko, daß der Trägerfilm während des Übertragens reißt, unserer Erfahrung nach äusserst gering. Schnitte können auch nicht dadurch verloren gehen, daß sie beim Übertragen auf dem Metall des befilmten Grids zu liegen kommen, da das Schlitzlochmuster von Überträger- und befilmtem Grid identisch sind; durch die Verstellmöglichkeiten des Kreuztisches können sie in Übereinstimmung gebracht werden. Außerdem ist es während des Übertragungsvorganges möglich, die Schnittbänder z.B. mit einer Wimper in ihrer Position zu manipulieren. Das vorsichtige Absaugen des Wassers zwischen den Grids verursacht keine Turbulenzen auf der Oberseite des Tropfens, wo die Schnittbänder liegen. Somit bleiben die Bänder in ihrer (manipulierten) Position und werden während des Übertragungsvorganges auch nicht beschädigt. Die Gefahr der Verunreinigung des Wassers im Trog des Diamantmessers ist nahezu ausgeschlossen, da die Schnittbänder mit ultraschallgereinigten, unbefilmten Überträgergrids aufgenommen werden. Dies ist vor allem bei größeren Schnittserien wichtig, wo Schnittbänder viele Male aus dem Trog aufgenommen werden und Kontaminationen sich dabei summieren. Werden die Bänder direkt mit befilmten und kohlebedampften Grids aufgenommen, wie in der Methode von Fahrenbach (1984), ist die Kontaminationsgefahr groß.

Auch ist nicht jede Serienschnitt-Methode für große Serien mit vielen Grids geeignet, wie Versuche mit der Schnitt-Technik von Anderson und Brenner (1971) und de Groot (in Druck; persönliche Mitteilungen) zeigten. Für unsere Anforderungen haben sich Methoden nach dem Prinzip von Gay und Anderson (1954) bewährt, wie sie auch von Stevens et al. (1980) modifiziert verwendet wurde. Unsere Technik ist jedoch apparativ und kostenmäßig weniger aufwendig als die von Stevens et al.; die Arbeit kann von einer einzelnen Person durchgeführt werden.

Dreidimensionale Rekonstruktionen mit Hilfe von Schnittserien ermöglichen Einsichten selbst in sehr komplexe Gewebestrukturen zu gewinnen. Die ersten Schnittserien von wachseingebetteten Präparaten sind von dem deutschen Anatom Klebs bekannt, der in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts damit die Grundlagen für dreidimensionale Gewebe-rekonstruktionen schuf; sein Rekonstruktionsprinzip hat heute noch Gültigkeit (sh. Review von Ware und LoPresti, 1975). Die technischen Möglichkeiten für dreidimensionale Rekonstruktionen haben sich im Lau-

fe der Jahre erheblich verbessert, angefangen von den Präparationsmethoden und Einbettungsmaterialien, über die Mikrotomie bis hin zu den Darstellungsmöglichkeiten für dreidimensionale Gewebestrukturen. Gerade die Darstellungsmöglichkeiten haben sich in den letzten Jahren durch den Einsatz von Computern dramatisch verbessert (sh. Review von Macagno et al., 1979). Es entstanden eine Reihe von Computer-gestützten Rekonstruktionssystemen (Baba et al., 1984; Bolender, 1986; Briarty und Jenkins, 1984; Capowski und Johnson, 1985; Hengstenberg et al., in Druck; Stevens et al., 1980; Street und Mize, 1983; Sundsten und Prothero, 1983; Vanden Berghe et al., 1986).

Wie verschiedene Rekonstruktionsversuche zeigten, sind Computer-gestützte Rekonstruktionssysteme anderen Methoden umso überlegener, je mehr Informationen verarbeitet werden müssen und je komplexer die Gewebestrukturen sind. Anfängliche Versuche mit einfachen Rekonstruktionsmethoden wie z.B. Zeichnungen auf Acetatfolien scheiterten daran, daß nur 10-15 Schnittebenen übereinandergelegt und dargestellt werden konnten; durch die Lichtreflexion an den Folienoberflächen waren die unteren Acetatfolien mit ihren Zeichnungen immer undeutlicher zu sehen, je mehr Folien übereinandergelegt wurden. Der Bau plastischer Modelle ist durch die Komplexität der Gewebestrukturen äußerst schwierig und vom Zeitaufwand her kaum durchführbar.

Im Zusammenhang mit den Rekonstruktionsversuchen auf Acetatfolien wurden auch verschiedene Methoden für das Ausrichten der aufeinanderfolgenden Schnittebenen (Rieder, 1981) getestet. Hierbei stellte sich heraus, daß die Genauigkeit des Alignments umso besser wurde, je mehr Informationen aus den EM-Aufnahmen herangezogen wurden. Eine Ausrichtung anhand weniger Strukturen, sogenannter intrinsischer Referenzmarken, führte vermehrt zu Ungenauigkeiten und Fehlern, da deren räumlicher Verlauf nicht vorhersehbar war. Nur solche Strukturen, die senkrecht zur Schnittebene in die Tiefe des Gewebeblocks verliefen, waren als intrinsische Referenzmarken geeignet. Die "best-fit"-Methode, bei der möglichst viele Strukturen mit scharf umrissenen Konturen für das Alignment herangezogen wurden, erwies sich bei der Auswertung relativ großer Schnittflächen als die zuverlässigste Methode. Dazu wurde am besten das EM-Negativ (bzw. dessen Kodalith-Kontaktkopie) mit seiner gesamten Information herangezogen.

Das Ausrichten blieb jedoch immer ein Kompromiß. Es traten im Schnitt immer leichte Verzerrungen auf, z.B. Stauchungen durch das Schneiden am Ultramikrotom, durch das Übertragen der Schnittbänder auf befilmte Grids und auch bei der elektronenmikroskopischen Auswertung der Schnitte durch Erwärmung von Trägerfilm und Ultradünnschnitt im Elektronenstrahl. Trotzdem lagen entsprechende Strukturen auf aufeinanderfolgenden Schnitten beim Alignment nie mehr als 2%, bezogen auf die Bilddiagonale, auseinander. Die Qualität der Computer-Rekonstruktionen, bei denen selbst feine Filopodienstrukturen einen kontinuierlichen Verlauf zeigen, d.h. kein "Springen" der Strukturen von Schnittebene zu Schnittebene zu sehen ist, beweist, daß die Serienschnitt-Technik und die ausgewählte Methode der Rekonstruktion für relativ große Gewebeausschnitte sehr gut geeignet waren.

Das Computer-Rekonstruktionssystem, wie es von uns benutzt wurde, diente zuerst zur Digitalisierung der Kodalith-Aufnahmenbänder, um zu versuchen, mit Hilfe des Computers die Zellgrenzen aus dem digitalisierten Bild herauszufiltern. Nach Optimierung des digitalisierten Bilds, wie z.B. Beseitigung von Ausleuchtungsfehlern und Hardware-Fehlern der Videokamera (Shading-Korrekturen), Kontrast- und Kantenverstärkung usw., war es möglich, durch weitere bildverarbeitende Schritte ca. 70-80% der Zellumrisse herauszufiltern. Für die eindeutige Identifikation einer individuellen Zelle mußte jedoch der Umriß einer Zelle vollständig erkannt werden. Dies bedeutete, daß die Zellumrißlinie (nahezu) geschlossen sein mußte, um in den nachfolgenden bildverarbeitenden Schritten einzelne Zellen markieren und von anderen unterscheiden zu können. Eine automatische Zellumrißerkennung mit Hilfe des Computers war somit nicht möglich und die Zellumrisse mußten von Hand gezeichnet werden.

Es führte auch der Versuch, die dreidimensionale Struktur des Gewebes durch einen Videofilm darzustellen, nicht zu dem gewünschten Erfolg. Die einzelnen Aufnahmenbänder waren dazu wieder digitalisiert worden, dann wurde von einer Schnittebene zur nächsten elektronisch überblendet. Um das für das Auge störende "harte" Springen von Bild zu Bild zu vermeiden, wurden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildebenen Zwischenbilder gerechnet, indem vom Grauwert eines Bildpunktes stufenweise zum Grauwert des entsprechenden Bildpunktes auf dem nachfolgenden Bild übergegangen wurde. Mit dem 3D-Eindruck des qualitativ guten Vi-

deofilms konnten jedoch keine eindeutigen Aussagen über den komplexen Verlauf der Nervenfasern gemacht werden. Insbesondere die Strukturierung der extrazellulären Hohlräume konnte damit nicht geklärt werden.

Erst mit der Darstellung der dreidimensionalen Strukturen in Computergrafiken, wie sie in den Abbildungen gezeigt werden, waren eindeutige Aussagen möglich. Die Reduktion der Informationsfülle auf das jeweils Wesentliche, z.B. isolierte Darstellung der Nervenzellen, isolierte Darstellung der extrazellulären Räume usw., war dabei ein wichtiger Punkt. In den Videofilmen war der Betrachter durch die Fülle an Informationen überfordert und vom Wesentlichen immer wieder abgelenkt worden: innerhalb weniger Minuten mußte die gesamte Information, die in mehreren hundert Aufnahmenbändern enthalten war, vom Betrachter verarbeitet werden. Mit der 3D-Computergrafik dagegen können bestimmte Strukturen isoliert dargestellt, aus unterschiedlichen Blickwinkeln betrachtet und - was einen optimalen 3D-Eindruck bietet - als Stereobilder gerechnet werden.

Es zeigte sich auch bei der Computer-gestützten, grafischen Darstellung, daß nur ein kleiner Bruchteil der Gesamtinformation in ein Stereobildpaar aufgenommen werden darf, um die Übersichtlichkeit zu erhalten. Zusätzlich eingezeichnete Strukturen können sehr schnell wesentliche Informationen schwerer verständlich machen oder ganz verdekken. Dies zeigten Versuche mit zusätzlich dargestellten Gliazellen. Insgesamt bietet die 3D-Computergrafik derzeit die meisten Darstellungsmöglichkeiten und ist umso interessanter je größer die Informationsfülle ist und je komplexer die Strukturen sind. Ein großer Vorteil der Computergrafik ist zudem, daß dreidimensionale Strukturen auf einer zweidimensionalen Vorlage, z.B. auf einem Papierbild, betrachtet werden können.

In der embryonalen Vogelretina wachsen die ersten Nervenfasern von Ganglienzellen im zentralen Bereich der Retina aus (Halfter et al., 1985) und suchen ihren Weg zur optischen Fissur. Dreidimensionale Rekonstruktionen dieses Bereiches in den Entwicklungsstadien, in denen die ersten Fasern zu erwarten sind, zeigen, daß keine der identifizierten und rekonstruierten Nervenfasern oder deren Filopodien die vitreale Basallamina berühren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu

denen anderer Autoren (Berlot und Goodman, 1984; Caudy und Bentley, 1986; Nardi, 1983; Nardi und Kafatos, 1976; Roberts und Patton, 1985), deren Untersuchungen jedoch nicht an retinalen Fasern im retinotectalen System von Vögeln gemacht wurden. Offensichtlich spielt der direkte Kontakt mit der Basallamina für diese Fasern des Zentralen Nervensystems für ihre Orientierung zur optischen Fissur keine Rolle, was z.B. für periphere Nervenfasern in Insekten offenbar entscheidend ist.

Bezeichnend für die auswachsenden retinalen Axone ist jedoch, daß sie bereits nach kurzer Entfernung vom Soma der Ganglienzelle einen bestimmten Abstand zur Basallamina einhalten, der mit zunehmendem Alter der Retina geringer wird und typisch für das jeweilige Entwicklungsstadium ist. Diese Tatsache ist umso interessanter als die Fasern selbst dann diesen Abstand einhalten, wenn sie die Möglichkeit hätten, näher an der Basallamina zu wachsen. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn sie in großen extrazellulären Hohlräumen, die bis dicht unter die Basallamina reichen, verlaufen. Dort wachsen die Nervenfasern nicht am vitrealen Ende der Hohlräume, sondern an deren seitlichen Wandung im Kontakt mit Gliazellen oder auch frei im extrazellulären Raum. Die Axone werden also nicht von den Gliazell-Endfüßchen daran gehindert, mit der Basallamina in Kontakt zu kommen, sondern der direkte Kontakt mit der Basallamina scheint grundsätzlich uninteressant zu sein. Es ist jedoch möglich, daß die Basallamina eine indirekte Rolle beim Richtungswachstum der Axone spielt. So könnten Substanzen, die von der Basallamina an die extrazelluläre Matrix abgegeben werden, die Orientierung der Nervenfasern beeinflussen. Der mit zunehmendem Alter der Retina geringer werdende Abstand der Axone zur Basallamina ist sicherlich ein sekundärer Effekt, dadurch bedingt, daß scleral neue Zellen entstehen und das embryonale Gewebe zusammendrängen. Damit läßt sich sicherlich auch die Wanderung der Nervenzellkörper erklären, die im 60-Stunden-Stadium noch außerhalb des rekonstruierten Gewebestücks liegen und im 68-Stunden-Stadium meist innerhalb der rekonstruierten Blocks.

Die in den Rekonstruktionen beobachteten Wachstumskegel sind relativ klein und weisen kurze Filopodien auf, so daß sich eine maximale Ausdehnung von ungefähr 10 μm ergibt. Lamellipodien, wie sie häufig bei Wachstumskegeln in vitro zu finden sind, konnten im Gewebe nicht nachgewiesen werden. Auffallend ist zudem, daß die Formen der Wachstumske-

gel sehr unterschiedlich sind. Im Vergleich zu Zellkulturen, wo sie meist die Form einer Hand haben und je nach Adhäsivität zum Substrat sich mit ihren Filopodien mehr oder weniger stark flächig ausdehnen, wirken die in-vivo-Wachstumskegel in der embryonalen Retina kompakter und sind in ihrer Form von rundlich-keulenförmig bis flach mit sehr unregelmäßiger Form, wenn sie z.B. auf den Zellkörpern anderer - wahrscheinlich ebenfalls neuronaler - Zellen wachsen und diese teilweise umschließen. Man kann deshalb nicht von einer "typischen" Wachstumskegelform sprechen.

Wie die Versuche anderer Autoren zeigten, steht die Größe eines Wachstumskegels eng im Zusammenhang mit dessen Adhäsivität zum Substrat (Caudy und Bentley, 1986; Harris et al., 1985; Roberts und Taylor, 1983; Tosney und Landmesser, 1985). In Zellkulturversuchen wurde beobachtet, daß die Größe der Wachstumskegel und die Länge der Filopodien zunahmen, wenn die Haftung am Substrat stärker wurde. In-vivo-Untersuchungen an auswachsenden peripheren Axonen im embryonalen Hühnchenflügel (Al-Ghaith und Lewis, 1982) und an zentralen Fasern in der Xenopus-Retina (Harris et al., 1985) zeigten relativ kleine growth cones, in ähnlichen Größenverhältnissen wie sie auch von uns nachgewiesen werden konnten. Dies läßt vermuten, daß im intakten Retinagewebe die Adhäsivität der Wachstumskegel zu benachbarten Strukturen, d.h. Gliazellen, anderen Neuronen und Axonen relativ gering ist und damit die räumliche Ausdehnung der growth cones verhältnismäßig klein. Die Tatsache, daß sowohl Axone als auch deren Wachstumskegel frei im extrazellulären Raum ohne Kontakt oder mit nur wenigen Kontaktstellen zu umgebenden Gliazellen zu finden sind, unterstützen diese Vermutung. Ebenso scheint die Adhäsivität der Axone untereinander sehr gering zu sein: kreuzen sich Axone, so ändern sie dadurch ihre Wachstumsrichtung nicht, obwohl die Fasern in allen untersuchten Fällen direkten Kontakt miteinander hatten; der bloße Kontakt zweier auswachsender Axone reicht unter in-vivo-Bedingungen nicht aus, um eine Bündelung der Fasern zu verursachen. Auch können Axone ein Faszikel wieder verlassen, um ihren Weg in einem anderen Faserbündel fortzusetzen (z.B. Neuron N7 in SER3). Die Wechselwirkung zwischen Fasern und ihre Adhäsivität zur Umgebung spielt für die Nervenfasern offensichtlich keine entscheidende Rolle für ihre Wegfindung in der Retina.

Unterhalb der vitrealen Basallamina sind in der frühembryonalen Vogel-

retina große extrazelluläre Hohlräume zu finden, die bis dicht unter die Basallamina reichen können; teilweise ist die Basallamina nur durch flache, epithelartige Gliazell-Endfüßchen von den Hohlräumen getrennt. Die extrazellulären Hohlräume zeigen in der dreidimensionalen Rekonstruktion eine schwammartige Struktur aus vielen, ineinander übergehenden Hohlräumen mit kurzen, zur optischen Fissur ausgerichteten Kanälen, die jedoch nicht durchgängig sind. Diese kurzen Kanäle decken sich nur in wenigen Fällen mit dem Verlauf der auswachsenden Nervenfasern.

Die Strukturierung der extrazellulären Räume, wie sie sich in den dreidimensionalen Rekonstruktionen darstellt, macht es unwahrscheinlich, daß sie als Leitstrukturen für die Navigation von Axonen dienen. Die vorhandene morphologische Struktur unterhalb der Basallamina reicht nicht aus, um die auswachsenden Axone "zeilsicher" zur optischen Fissur zu leiten. Die von Krayanek und Goldberg (1981) beschriebenen Kanäle konnten in der Wachtel-Retina nicht nachgewiesen werden. Es scheint eher der Fall zu sein, daß das anfänglich schwammartige Gewebe unter der Basallamina mit seinen großen extrazellulären Räumen in seiner weiteren Entwicklung durch nachwandernde Zellen aus der scleral liegenden Proliferationszone zunehmend dichter wird. Die kurzen, zur optischen Fissur ausgerichteten extrazellulären Kanäle sind wahrscheinlich eine Folge des peripheren Wachstums der embryonalen Retina und unterstützen höchstens die Orientierung der auswachsenden Axone; die gerichteten Kanäle sind mit Sicherheit aber nicht die Ursache für das gerichtete Nervenfaserwachstum. Die in der älteren Retina vorhandenen Kanäle, in denen die Axonbündel zu finden sind (sh. Abb. 28), dürften mit hoher Wahrscheinlichkeit sekundär entstehen: bereits vorhandene Nervenfaserbündel werden von den dichter werdenden Gliazellen umschlossen, wodurch eine kanalartige Strukturierung der Gliazellen in der Umgebung der Faszikel zustande kommt. Diese Vorstellungen decken sich mit den Beobachtungen aus den rasterelektronenmikroskopischen Studien von Suburu et al. (1979). Die Schlüsse aus den Untersuchungen von Krayanek und Goldberg sind deshalb sehr zweifelhaft, weil diese aus der Auswertung lichtmikroskopischer Serienschnitte und elektronenmikroskopischer Einzelschnitte hergeleitet wurden. Da jedoch, wie unsere Untersuchungen zeigen, bei der Betrachtung einzelner elektronenmikroskopischer Schnitte durch die Anordnung der Gliazellen und deren Endfüßchen sehr leicht der Eindruck extrazellulärer Kanäle vor-

getäuscht werden kann (sh. Abb. 19, 20) und da lichtmikroskopische Serienschnitte die teilweise filigrane Struktur der extrazellulären Räume kaum auflösen können, besteht sehr leicht die Gefahr, die kanalähnlichen Querschnitte auf den einzelnen Aufnahmen falsch zu interpretieren.

In den Rekonstruktionen SER2 und SER3 wurden Filopodien von auswachsenden Axonen beobachtet, die in taschenförmige Einstülpungen von Gliazellen einwachsen. Dabei ist in der Umgebung der Filopodienspitze elektronendichteres Material in der Gliazellmembran zu sehen; das Gliazellcytoplasma am Ende der Tasche ist dagegen weniger elektronendicht als das restliche Cytoplasma. Derartige Strukturen wurden auch von Bastiani und Goodman (1984) beschrieben: in Heuschreckenembryonen inserieren Filopodien auswachsender Axone in andere Wachstumskegel. Die Vesikel im Cytoplasma der Wachstumskegel, wie sie von diesen Autoren beobachtet wurden, waren in den Gliazellen der Rekonstruktionen SER2 und SER3 nicht zu finden. In der 8 Stunden jüngeren Retina von SER1 waren solche Strukturen nicht vorhanden.

Die Ausbildung von inserierenden Filopodien legt die Vermutung nahe, daß ein Stoff- oder Informationsaustausch zwischen auswachsenden Ganglienzellaxonen und benachbarten Gliazellen stattfindet. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtungen, daß häufig filopodienartige Fortsätze von Gliazellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Nervenfasern zu finden sind (sh. Abb. 27c). Weiterhin werden Axone immer wieder von benachbarten Gliazellen teilweise oder ganz umschlossen; dies erfolgt jedoch nur über kurze Distanzen von 0,5-1 µm. Offensichtlich scheinen die Gliazellen für die auswachsenden Nervenfasern eine bedeutende Rolle zu spielen, denn nur so werden die Ausbildungen der beschriebenen Strukturen verständlich.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen, daß für die Orientierung der auswachsenden Ganglienzellaxone in der frühembryonalen Vogelretina der direkte Kontakt mit der Basallamina nicht von Bedeutung ist. Auch umgebende morphologische Strukturen, wie von benachbarten Gliazellen gebildete extrazelluläre Kanäle, sind nach den vorliegenden Ergebnissen der Rekonstruktionen als Leitstrukturen nicht vorstellbar. Die Adhäsion der Wachstumskegel zur Umgebung scheint relativ gering zu sein; dafür spricht die Morphologie der Wachstumske-

gel. Auch scheint die Adhäsion der Axone untereinander im Gewebe gering zu sein, da der direkte Kontakt zweier Fasern keine Richtungsänderung bewirkt. Eine bedeutende Rolle für die auswachsenden Axone und deren Orientierung zur optischen Fissur scheinen jedoch die umgebenden Gliazellen zu spielen, da interessante Kontakte zwischen diesen und den auswachsenden Fasern zu finden sind. Manche dieser Strukturen wie z.B. die inserierenden Filopodien der Wachstumskegel können jedoch bis jetzt in ihrer Bedeutung nicht interpretiert werden. Genauere Untersuchungen dieser Gliazell-Axon-Wechselwirkungen könnten weitere Hinweise erbringen, ob ein Informationsaustausch zwische Gliazellen und Axonen für die Orientierung der Nervenfasern von Bedeutung ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Dreidimensionale Geweberekonstruktionen im zentralen Teil der frühembryonalen Wachtel-Retina sollten zeigen, ob morphologische Strukturen für das zielgerichtete Wachstum der ersten Ganglienzellaxone verantwortlich sein könnten und welche Wechselwirkungen mit der Umgebung für die auswachsenden Nervenfasern dabei eine Rolle spielen. Um Aussagen über die morphologischen Gegebenheiten in der embryonalen Retina machen zu können, wurden die Präparationsbedingungen für die Gefrierfixierung und Gefriersubstitution, die eine äußerst schonende Entwässerung und chemische Fixierung des Gewebes ermöglichen, wesentlich verbessert. Es wurden verschiedene Gefrierschutzmittel für die Gefrierfixierung und unterschiedliche Bedingungen für die chemische Vorfixierung des Gewebes getestet. Für die dreidimensionalen Rekonstruktionen wurde eine Serienschnitt-Technik für Ultradünnschnitte entwikkelt.

Alle "klassischen" Gefrierschutzmittel, die für die Gefrierfixierung untersucht wurden, verursachten mehr oder weniger starke Zerstörung der Gewebestrukturen. Lediglich Dimethylformamid (DMF) und - mit gewissen Einschränkungen - Dimethylsulfoxid (DMSO) führten zu ausgezeichneter Strukturerhaltung. Vorfixierung mit einer Glutaraldehyd/-Formaldehyd (GA/FA) - Mischung führte zu besseren Ergebnissen als GA allein.

Die dreidimensionalen, Computer-gestützten Geweberekonstruktionen zeigten, daß für die Orientierung der auswachsenden Axone der direkte Kontakt mit der Basallamina keine Rolle spielt. Die extrazellulären Räume können aufgrund ihrer Strukturierung ebensowenig zum zielgerichteten Wachstum der Nervenfasern beitragen; extrazelluläre Kanäle, die durchgängig und zur optischen Fissur ausgerichtet sind, konnten nicht nachgewiesen werden. Die Adhäsivität der Axone und Wachstumskegel zu umgebenden Strukturen scheint relativ gering zu sein, da die Wachstumskegel klein sind (maximal 10 μm Ausdehnung) und der direkte Kontakt zweier Axone ohne sichtbaren Einfluß auf deren Wachstumsrichtung bleibt. Da jedoch besondere Kontakte zwischen Gliazellen und auswachsenden Axonen beobachtet werden konnten, wie z.B. Filopodien von

Wachstumskegeln, die in Taschen von Gliazellen einwachsen, wird vermutet, daß die umgebenden Gliazellen beim Wachstum der Nervenfasern eine Rolle spielen. Ob die Gliazellen für die Orientierung der Fasern wichtig sind, ist unklar.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Al-Ghaith, L. K., J. H. Lewis: Pioneer growth cones in virgin mesenchyme: an electron-microscope study in the developing chick wing. J. Embryol. Exp. Morph. **68**, 149-160 (1982).

Anderson, R. G. W., R. M. Brenner: Accurate placement of ultrathin sections on grids; control by sol-gel phases of a gelatin flotation fluid. Stain Tech. **46**, 1-6 (1971).

Ariëns-Kappers, C. U.: Further contributions on neurobiotaxis. IX. An attempt to compare the phenomenon of neurobiotaxis with other phenomena of taxis and tropism. The dynamic polarization of the neuron. J. Comp. Neurol. **27**, 261-298 (1917).

Auerbach, R., L. Kubai, D. Knighton, J. Folkman: A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. Dev. Biol. **41**, 391-394 (1974).

Baba, N., M. Naka, Y. Muranaka, S.-I. Nakamura, I. Kino, K. Kanaya: Computer-aided stereographic representation of an object reconstructed from micrographs of serial thin sections. Micron Microsc. Acta **15**, 221-226 (1984).

Barnard, T.: Ultrastructural effects of the high molecular weight cryoprotectants Dextran and polyvinyl pyrrolidone on liver and brown adipose tissue in vitro. J. Microsc. **120**, 93-104 (1980).

Bastiani, M. J., C. S. Goodman: Neuronal growth cones: specific interactions mediated by filopodial insertion and induction of coated vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1849-1853 (1984).

Bastiani, M. J., J. A. Raper, C. S. Goodman: Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. I. Selective affinity of the G growth cone for the P cells within the A/P fascicle. J. Neurosci. **4**, 2311-2328 (1984).

Bastiani, M. J., C. Q. Doe, S. L. Helfand, C. S. Goodman: Neuronal specifity and growth cone guidance in grasshopper and Drosophila embryos. Trends Neur. Sci. **8**, 257-266 (1985).

Beaulaton, J., R. Gras: Influence of aldehyde fixatives on the ultrastructure of the prothoracic gland cells in Rhodnius prolixus (Insecta, Heteroptera) with special reference to their osmotic effects. Microscopica Acta **82**, 351-366 (1980).

Benshalom, G., T. S. Reese: Ultrastructural observations on the cytoarchitecture of axons processed by rapid-freezing and freeze-substitution. J. Neurocytol. **14**, 943-960 (1985).

Berlot, J., C. S. Goodman: Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: adhesive hierachy of epithelial and neuronal surfaces. Science **223**, 493-496 (1984).

Bolender, R. P.: Computer programs for biological stereology. In: J.

K. Koehler (Hrsg.) Advanced techniques in biological electron microscopy. Bd. III. Springer, Berlin Heidelberg (1986).

Bonhoeffer, F., J. Huf: Position-dependent properties of retinal axons and their growth cones. Nature **315**, 409-410 (1985).

Bray, D.: Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension. Dev. Biol. **102**, 379-389 (1984).

Briarty, L. G., P. H. Jenkins: GRIDSS: an integrated suite of microcomputer programs for three-dimensional graphical reconstruction from serial sections. J. Microsc. **134**, 121-124 (1984).

Capowski, J. J., E. M. Johnson: A simple hidden line removal algorithm for serial section reconstruction. J. Neurosci. Meth. **13**, 145-152 (1985).

Carney, P. R., J. Silver: Studies on cell migration and axonal guidance in the developing distal auditory system of the mouse. J. Comp. Neurol. **215**, 359-369 (1983).

Caudy, M., D. Bentley: Pioneer growth cone morphologies reveal proximal increases in substrate affinity within leg segments of grasshopper embryos. J. Neurosci. **6**, 364-379 (1986).

Cheng, T. P. O., T. S. Reese: Polarized compartmentalization of organelles in growth cones from developing optic tectum. J. Cell Biol. **101**, 1473-1480 (1985).

Constantine-Paton, M.: Axonal navigation. BioScience **29**, 526-532 (1979).

Edelman, G. M.: Cell adhesion molecules. Science **219**, 450-457 (1983).

Fahrenbach, W. H.: Continuous serial thin sectioning for electron microscopy. J. Electron Microsc. Tech. **1**, 387-398 (1984).

Favre, D., A. Sans: A fixation technique for better ultrastructural preservation of nerve endings in the vestibular sensory epithelium - a TEM and x-ray microanalysis study. Micron Microsc. Acta **14**, 319-327 (1983).

Gay, H., T. F. Anderson: Serial sections for electron microscopy. Science **120**, 1071-1073 (1954).

Glauert, A. M.: Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: A. M. Glauert (Hrsg.) Practical methods in electron microscopy. North-Holland, Amsterdam (1975).

Groot, D. M. G. de: Improvements of the serial section method in relation to the estimation of the numerical density of complex-shaped synapses. In: A. Reith, T. M. Mayhew (Hrsg.) Stereology in pathology. Hemisphere/McGraw-Hill, New York (in Druck).

Gundersen, R. W.: Sensory neurite growth cone guidance by substrate adsorbed nerve growth factor. J. Neurosci. Res. **13**, 199-212 (1985).

Gundersen, R. W., J. N. Barrett: Characterization of the turning re-

sponse of dorsal root neurites toward the nerve growth factor. J. Cell Biol. **87**, 546-554 (1980).

Gundersen, R. W., J. N. Barrett: Neurite growth cone - substratum adherance increases in vitro. Dev. Brain Res. **12**, 21-26 (1984).

Halfter, W., M. Claviez, U. Schwarz: Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites. Nature **292**, 67-70 (1981).

Halfter, W., S. Deiss, U. Schwarz: The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. J. Comp. Neurol. **232**, 466-480 (1985).

Harris, W. A., C. E. Holt, T. A. Smith, N. Gallenson: Growth cones of developing retinal cells in vivo, on culture surfaces, and in collagen matrices. J. Neurosci. Res. **13**, 101-122 (1985).

Harrison, R. G.: The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exp. Zool. **9**, 787-846 (1910).

Harvey, D. M. R.: Freeze-substitution. J. Microsc. **127**, 209-221 (1982).

Hayat, M. A.: Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York (1981).

Hengstenberg, R., H. Bülthoff, B. Hengstenberg: Three-dimensional reconstruction and stereoscopic display of neurons in the fly visual system. In: N. J. Strausfeld (Hrsg.) Neuroanatomical techniques. Springer, Berlin Heidelberg New York (in Druck).

Henry, E. C.: A method for obtaining ribbons of serial sections of plastic embedded specimens. Stain Tech. **52**, 59-60 (1977).

Humbel, B. M.: Gefriersubstitution - ein Weg zur Verbesserung der morphologischen und cytochemischen Untersuchung biologischer Proben im Elektronenmikroskop. Diss. Nr. 7609, ETH Zürich (1984).

Humbel, B., T. Marti, M. Müller: Improved structural preservation by combining freeze-substitution and low-temperature embedding. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. **16**, 585 (1983).

Humbel, B., M. Müller: Freeze-substitution and low-temperature embedding. Proc. 8th Eur. Reg. Conf. Electron Microscopy, Budapest **3**, 1789 (1984).

Jaffe, L. F., M.-m. Poo: Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field. J. Exp. Zool. **209**, 115-128 (1979).

Kalt, M. R., B. Tandler: A study of fixation of early amphibian embryos for electron microscopy. J. Ultrastr. Res. **36**, 633-645 (1971).

Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. **27**, 137A-138A (1965).

Krayanek, S., S. Goldberg: Oriented extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina. Dev. Biol. **84**, 41-50 (1981).

Landis, S. C.: Neuronal growth cones. Ann. Rev. Physiol. **45,** 567-580 (1983).

Letourneau, P. C.: Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. Dev. Biol. **44,** 77-91 (1975a).

Letourneau, P. C.: Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Dev. Biol. **44,** 92-101 (1975b).

Letourneau, P. C.: Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. Dev. Biol. **66,** 183-196 (1978).

Letourneau, P. C.: Axonal growth and guidance. Trends Neurosci. **6,** 451-455 (1983).

Levi-Montalcini, R., V. Hamburger: A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. J. Exp. Zool. **123,** 233-288 (1953).

Macagno, E. R., C. Levinthal, I. Sobel: Three-dimensional computer reconstruction of neurons and neuronal assemblies. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **8,** 323-351 (1979).

McGann, L. E.: Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology **15,** 382-390 (1978).

McKerracher, L. J., I. B. Heath: Microtubules around migrating nuclei in conventionally-fixed and freeze-substituted cells. Protoplasma **125,** 162-172 (1985).

Meißner, D.: Versuche zur Erhaltung der nativen Struktur embryonaler Hühnchenretina für Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Tübingen (1983).

Moor, H.: Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. Z. Zellforsch. **62,** 546-580 (1964).

Moor, H., G. Bellin, C. Sandri, K. Akert: The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. Cell Tissue Res. **209,** 201-216 (1980).

Müller, M., T. H. Marti, S. Kriz: Improved structural preservation by freeze-substitution. Proc. 7th Eur. Reg. Conf. Electron Microscopy, Den Haag **2,** 270 (1980).

Nardi, J. B.: Neuronal pathfinding in developing wings of the moth Manduca sexta. Dev. Biol. **95,** 163-174 (1983).

Nardi, J. B., F. C. Kafatos: Polarity and gradients in lepidopteran wing epidermis. II. The differential adhesiveness model: gradient of a non-diffusible cell surface parameter. J Embryol. Exp. Morph. **36,** 489-512 (1976).

Niedermeyer, W., G. R. Parish, H. Moor: Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. Protoplasma **92,** 177-193 (1977).

Nordlander, R. H., M. Singer: Spaces precede axons in Xenopus embryonic spinal cord. Exp. Neurol. **75**, 221-228 (1982a).

Nordlander, R. H., M. Singer: Morphology and position of growth cones in the developing Xenopus spinal cord. Dev. Brain Res. **4**, 181-193 (1982b).

Patel, N. B., Z.-p. Xie, S. H. Young, M.-m. Poo: Response of nerve growth cone to focal electric currents. J. Neurosci. Res. **13**, 245-256 (1985).

Plattner, H., L. Bachmann: Cryofixation: a tool in biological ultrastructural research. Int. Rev. Cytol. **79**, 237-304 (1982).

Ramòn y Cajal, S.: Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonaire. Anat. Ang. **5**, 609-613 (1890).

Raper, J. A., M. Bastiani, C. S. Goodman: Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. I. Divergent choices made by the growth cones of sibling neurons. J. Neurosci. **3**, 20-30 (1983a).

Raper, J. A., M. Bastiani, C. S. Goodman: Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways. J. Neurosci. **3**, 31-41 (1983b).

Raper, J. A., M. J. Bastiani, C. S. Goodman: Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. J. Neurosci. **4**, 2329-2345 (1984).

Rees, R. P., T. S. Reese: New structural features of freeze-substituted neuritic growth cones. Neurosci. **6**, 247-254 (1981).

Reimer, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer, Berlin (^{2}1967).

Revell, R. S. M., A. W. Agar: The preparation of uniform plastic films. Brit. J. appl. Phys. **6**, 23 (1955).

Richter, H.: Die Reaktion hochpermeabler Pflanzenzellen auf drei Gefrierschutzstoffe (Glyzerin, Äthylenglykol, Dimethylsulfoxid). Protoplasma **65**, 155-166 (1968a).

Richter, H.: Die Gefrierresistenz glyzerinbehandelter Campanula-Zellen. Protoplasma **66**, 63-78 (1968b).

Rieder, C. L.: Thick and thin serial sectioning for the three-dimensional reconstruction of biological ultrastructure. In: J. N. Turner (Hrsg.) Three-dimensional ultrastructure in biology. Academic Press, New York (1981).

Robards, A. W., U. B. Sleytr: Low temperature methods in biological electron microscopy. In: A. M. Glauert (Hrsg.) Practical methods in electron microscopy. Elsevier, Amsterdam (1985).

Roberts, A., D. T. Patton: Growth cones and the formation of central and peripheral neurites by sensory neurones in amphibian embryos. J.

Neurosci. Res. **13**, 23-38 (1985).

Roberts, A., J. S. H. Taylor: A study of the growth cones of developing embryonic sensory neurites. J. Embryol. Exp. Morph. **75**, 31-47 (1983).

Schaefer, V. J., D. Harker: Surface replicas for use in electron microscopy. J. appl. Phys. **13**, 427 (1942).

Schiller, A., R. Taugner: Freeze-fracturing and deep-etching with the volatile cryoprotectant ethanol reveals true membrane surfaces of kidney structures. Cell Tissue Res. **210**, 57-69 (1980).

Silver, J., R. M. Robb: Studies on the development of the eye cup and optic nerve in normal mice and in mutants with congenital optic nerve aplasia. Dev. Biol. **68**, 175-190 (1979).

Silver, J., R. L. Sidman: A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons. J. Comp. Neurol. **189**, 101-111 (1980).

Singer, M., R. H. Nordlander, M. Egar: Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning. J. Comp. Neurol. **185**, 1-22 (1979).

Skaer, H.: Chemical cryoprotection for structural studies. J. Microsc. **125**, 137-147 (1982).

Solomon, F.: Guiding growth cones. Cell **24**, 279-280 (1981).

Sperry, R. W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50**, 703-710 (1963).

Stensaas, S. S., C. Q. Edwards, L. J. Stensaas: An experimental study of hyperchromic nerve cells in the cerebral cortex. Exp. Neurol. **36**, 472-487 (1972).

Stevens, J. K., T. L. Davis, N. Friedman, P. Sterling: A systematic approach to reconstructing microcircuitry by electron microscopy of serial sections. Brain Res. Rev. **2**, 265-293 (1980).

Stoner, C. D., H. D. Sirak: Osmotically-induced alterations in volume and ultrastructure of mitochondria isolated from rat liver and bovine heart. J. Cell Biol. **43**, 521-538 (1969).

Street, C. H., R. R. Mize: A simple microcomputer-based three-dimensional serial section reconstruction system (MICROS). J. Neurosci. Meth. **7**, 359-375 (1983).

Suburo, A., N. Carri, R. Adler: The environment of axonal migration in the developing chick retina: a scanning electron microscopic (SEM) study. J. Comp. Neurol. **184**, 519-536 (1979).

Sundsten, J. W., J. W. Prothero: Three-dimensional reconstruction from serial sections: II. A microcomputer-based facility for rapid data collection. Anat. Rec. **207**, 665-671 (1983).

Thanos, S., F. Bonhoeffer, U. Rutishauser: Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1906-1910 (1984).

Tosney, K. W., L. T. Landmesser: Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb. Dev. Biol. **109**, 193-214 (1985).

Trisler, G. D., M. D. Schneider, M. Nirenberg: A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2145-2149 (1981).

Vanden Berghe, W., P. Aerts, H. Claeys, W. Verraes: A microcomputer-based graphical reconstruction technique for serial sectioned objects, with hidden line removal. Anat. Rec. **215**, 84-91 (1986).

Verna, A.: A simple quick-freezing device of ultrastructural preservation: evaluation by freeze-substitution. Biol. Cell **49**, 95-98 (1983).

Völker, W., H. Meschede, J. Weil, U. Thurm: Immersion-freezing and freeze-substitution of irregularly shaped specimens with the aid of a cryo-injector. Mikroskopie **41**, 351-359 (1984).

Ware, R. W., V. LoPresti: Three-dimensional reconstruction from serial sections. Int. Rev. Cytol. **40**, 325-440 (1975).

Weiss, P.: Die Funktion transplantierter Amphibienextremitäten. Aufstellung einer Resonanztheorie der motorischen Nerventätigkeit auf Grund bestimmter Endorgane. Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech. **102**, 635-672 (1924).

Weiss, P.: In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. J. Exp. Zool. **68**, 393-448 (1934).

Williams, R. J., D. Harris: The distribution of cryoprotective agents into lipid interfaces. Cryobiology **14**, 670-680 (1977).

Die vorliegende Arbeit entstand am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Uli Schwarz. Ihm möchte ich an dieser Stelle ganz besonders für die großzügige Unterstützung, mit der diese technisch aufwendige Arbeit erst ermöglicht wurde, danken sowie auch für seine wertvollen Hinweise und Diskussionen. Meinen Kolleginnen und Kollegen in der neurobiologischen Arbeitsgruppe danke ich für die kritischen und konstruktiven Diskussionen, die diese Arbeit sehr gefördert haben.

Mein Dank gilt auch Dr. Hermann Frank, der mir insbesondere bei technischen Problemen mit seiner großen Erfahrung zur Seite stand. Bei der Herstellung der Schnittserien erwies Inge Zimmermann ihre ruhige Hand am Ultramikrotom. Regine Braun und Jürgen Sauter halfen mir bei den Präparationen im EM-Labor. Fotografische Arbeiten wurden von Roswitha Grömke-Lutz, Brigitte Sailer und Markus Niethammer immer schnell und in ausgezeichneter Qualität ausgeführt. Einige Zeichnungen wurden von Doris Eder angefertigt. Allen Kolleginnen und Kollegen im EM-Labor möchte ich für die stets freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Danken möchte ich auch Dr. Heinz Schwarz vom MPI für Biologie, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand; seine technische Hilfe und seine neuen Ideen waren für mich immer sehr wertvoll.

Für die kollegiale Zusammenarbeit danke ich York Stierhof vom Hygiene-Institut/Tübingen und Rainer Merkl vom MPI für Biochemie/Martinsried, der mich beim Bau der Substitutionsapparatur unterstützte.

Die dreidimensionalen Computer-Rekonstruktionen entstanden am MPI für Astrophysik/Garching mit freundlicher Unterstützung von Dr. W. Hillebrandt und der Hilfe von Hans-Werner Paulsen und Manfred Reuter, denen ich dafür herzlich danken möchte. Insbesondere durch die Hilfsbereitschaft von Hans-Werner Paulsen, seine Geduld und seine Programmierkunst war die Darstellung der Ergebnisse in dieser beeindruckenden Form erst möglich.

Lebenslauf

	Dieter Meißner
Geburtstag:	21. September 1953
Geburtsort:	Stuttgart
Familienstand:	verheiratet seit 1982
Schulausbildung:	1960-1964 Grundschule in Reichenbach/Fils
	1964-1971 Gymnasium in Plochingen/Neckar
	1971-1974 Wirtschaftsgymnasium in Esslingen/Neckar; Abitur
Studium:	1974-1976 Mathematik an der Universität Tübingen
	1976-1983 Biologie an der Universität Tübingen
	(1982-1983 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Thema: Versuche zur Erhaltung der nativen Struktur embryonaler Hühnchenretina für Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop.)
Promotion:	Seit 1983 am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen über das Thema der vorliegenden Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, R. Apfelbach, C.-F. Bardele, F.-W. Bentrup, W. Bessler, G.-U. Brillinger, V. Braun, K. Dobat, W. Engelmann, H. Erkert, H. Frank, K. G. Grell, J. Grunewald, F. Habermalz, K. G. Hantke, H. Haselmann, J. Kiepenheuer, G. Mickoleit, F. P. Möhres, W. Müller, F. Oberwinkler, W. Pfeiffer, H.-U. Schnitzler, H. Schwarz, U. Schwarz, B. Schwemmle, H. U. Seitz, U. Seitz, G. Weitzel, P. Wenk.